Prof. dr. doc. G. ZARNEA

Conf. dr. GR. MIHĂESCU

IMUNOLOGIE



EDITURA UNIVERSITĂŢII BUCUREŞTI

1995

Prof. dr. doc. G. Zarnea
Membru corespondent
al Academiei Române

Conf. dr. Gr. Mihăescu

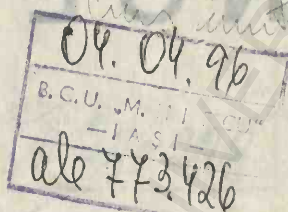
IMUNOLOGIE



EDITURA UNIVERSITĂŢII BUCUREŞTI

1995

Referenţi ştiinţifici: Prof. dr. Angheluţă Vădineanu
Prof. dr. doc. Dumitru Mişcalencu



ISBN - 973-9160-37-9

CUPRINS

INTRODUCERE

Imunologia este o disciplină de sine stătătoare în plină evoluţie, una dintre cele mai cuprinzătoare şi competitive ştiinţifice moderne. Ea este o ramură a ştiinţelor biologice, caracterizată printr-un dinamism extrem de accentuat, cu o diversificare mereu crescândă a activităţilor normale şi patologice, în care funcţia imunitară este implicată. Imunologia se bazează pe o serie de concepte biologice pentru explicarea funcţiei imunitare ca funcţie esenţială a organismului.

Imunologia s-a dezvoltat iniţial, ca un domeniu al Microbiologiei, sprijinindu-se pe Patologie şi Biochimie, dar astăzi este implicată în toate disciplinele biologice de bază, precum şi în numeroase specialităţi clinice.

Termenul de „imunitate" are o provenienţă socială: în Roma antică, persoanele scutite de impozite erau considerate „imune". Sensul termenului s-a extins, ulterior desemnând persoanele scutite de a suferi efectele infecţiei cu agenţi patogeni.

Obiectul de studiu al Imunologiei a evoluat odată cu progresul ştiinţelor biologice în general şi al aprofundării cunoaşterii funcţiilor de apărare în special.

La începuturile sale Imunologia a studiat reactivitatea organismului uman şi animal şi elaborarea răspunsului imun în cursul infecţiei cu agenţi patogeni, precum şi particularităţile ţesuturilor, celulelor şi moleculelor care condiţionează instalarea stării de imunitate. În sens clasic, noţiunea de imunitate definea starea de nereceptivitate sau de rezistenţă a organismului faţă de un agent patogen infecţios, atunci când erau îndeplinite toate condiţiile pentru apariţia unei maladii infecţioase. Din acest motiv, Imunologia s-a conturat, iniţial, ca un domeniu al Microbiologiei. Efectul activivării funcţiei imunitare era considerat ca fiind exclusiv benefic pentru organism.

Începând cu anii '60 interesul ştiinţific pentru Imunologie a crescut considerabil, din două motive: a) s-a demonstrat că funcţia imunitară este esenţială pentru organism, insuficienţa sa mărind riscul infecţiilor cu microorganisme patogene sau potenţial patogene, iar disfuncţia imunitară severă este

incompatibilă cu viaţa; b) s-a arătat că activarea funcţiei imunitare are nu numai un rol benefic pentru organism, ci uneori determină apariţia unor leziuni tisulare severe, chiar ireversibile sau facilitează manifestarea unor stări patologice. Iată câteva situaţii de acest gen:

*1) **Stările de hipersensibilitate** sunt caracterizate prin faptul că organismul, la primul contact cu o anumită substanţă străină se sensibilizează faţă de aceasta şi la un contact ulterior, chiar cu cantităţi foarte mici ale substanţei respective, reacţionează cu manifestări patologice de intensităţi variabile, al căror rezultat final poate fi fatal; alergia la polen, la diferite medicamente (penicilină), alergiile alimentare, sensibilitatea tegumentară (de contact) faţă de diferite substanţe chimice (coloranţi etc.);*

*2) **Maladiile autoimune** sunt manifestări patologice ale activării funcţiei imunitare şi constituie un domeniu medical vast, în continuă expansiune. Mecanismul general al apariţiei lor este întreruperea stării de toleranţă perfectă pe care sistemul imunitar normal o manifestă faţă de componentele chimice proprii organismului. Toleranţa este rezultatul unui proces de selecţie clonală care are loc în perioada dezvoltării embrionare a celulelor efectoare ale răspunsului imun. Datorită unor stări anormale legate de procese de îmbătrânire, infecţioase şi patologice degenerative sau datorate utilizării subsatnţelor medicamentoase, în organism apar modificări chimice tisulare care nu mai sunt tolerate de sistemul imunitar. Consecinţa este declanşarea unui răspuns imun faţă de componentele proprii ale organismului. Se iniţiază astfel un conflict autoimun, în care sistemul imunitar se activează şi componentele modificate chimic devin ţinta activităţii sale;*

*3) **Respingerea grefelor de ţesuturi şi organe** este rezultatul activării sistemului imunitar sub acţiunea componentelor chimice proprii ţesutului sau organului grefat. Autografele sunt tolerate totdeauna. Cu cât diferenţele genetice şi biochimice între organismul donor şi receptor de grefă sunt mai accentuate, cu atât grefa este respinsă mai repede.*

Datorită extinderii sferei de cuprindere a funcţiei imunitare, în concepţia modernă, ea se efineşte ca o proprietate biologică esenţială a organismului uman şi animal, care constă în capacitatea de a diferenţia foarte rapid şi specific, substanţele proprii de cele străine. Faţă de substanţele proprii, sistemul imunitar este tolerant, deorece a „învăţat" să le recunoască în timpul vieţii embrionare, dar diferenţiază cu mare fineţe substanţele străine, faţă de care se activează prompt pentru a le îndepărta din organism.

Componentele chimice proprii organismului, pe care sistemul imunitar le tolerează sunt incluse în noţiunea de „self" (englez = propriu), iar cele străine poartă denumirea generică de „substanţe nonself" sau antigene.

Funcţia imunitară este o funcţie biologică esenţială, prin intermediul căreia organismul diferenţiază substanţele self de cele nonself şi are rol hotărâtor pentru păstrarea homeostaziei mediului intern şi a individualităţii biochimice a fiecărui organism. Sistemul imunitar recunoaşte şi tolerează structurile chimice proprii organismului, dar se activează în prezenţa celor care se abat de la normele chimice tolerate şi le îndepărtează. Funcţia sa fundamentală – discriminarea între self şi nonself – este mediată de receptori celulari şi molecule solubile cu rol de recunoaştere. Aşa cum sistemul genetic asigură stabilitatea şi integritatea unei specii ca sistem biologic, sistemul imunitar asigură păstrarea homeostazei biochimice a organismului.

Etapele dezvoltării imunologiei ca ştiinţă

Imunologia este o ştiinţă relativ tânără, care a apărut iniţial ca un domeniu al Microbiologiei, după descoperirile lui Pasteur şi Metchnikoff, cu care păstrează încă legături de importanţă fundamentală, deşi astăzi imunologia este una dintre ramurile cele mai importante şi mai dinamice ale ştiinţelor biologice.

Apariţia Imunologiei ca ştiinţă a fost precedată cu milenii, de observaţii empirice, referitoare la faptul că vindecarea unor boli infecţioase era urmată de o stare de rezistenţă permanentă la reinfecţie sau cel mult, de forme uşoare de îmbolnăvire.

Cu 2–3 secole înaintea erei noastre, în China şi India s-a observat că unele maladii infecţioase foarte grave (variola, ciuma), induc o stare de imunitate foarte solidă la persoanele care supravieţuiesc, datorită căreia rezistă la reinfecţii ulterioare.

În infecţia variolică apar leziuni caracteristice, în special pe tegumentul feţei (vărsat de vânt). Leziunile primare sunt numeroase vezicule mici pline cu exudat clar, care se tulbură ulterior. Vezicula se sparge, se formează o crustă şi după vindecare rămâne o cicatrice pentru tot restul vieţii. Primele încercări de vaccinare antivariolocă au constat în infectarea voită a persoanelor sănătoase, în folosirea obiectelor foştilor bolnavi sau chiar în prizarea prin inhalare a maceratului de cruste uscate. Aceste procedee de variolizare prezentau riscul unei infecţii cu gravitate necontrolată, condiţionată de cantitatea de inocul, de virulenţa agentului, care puteau depăşi capacitatea de apărare a organismului.

În 1418, procedeul variolizării a fost introdus în Anglia de Mary Wortley Montagu şi practicat o perioadă, cu toate riscurile unei îmbolnăviri grave, chiar cu sfârşit letal.

Vaccinarea antivariolică a fost introdusă în practică de către medicul veterinar englez E. Jenner (1796). Vaccinul este un virus infecţios pentru bovine (cowpox).

El a pornit de la observaţia, că în cursul marilor epidemii de variolă, mulgătorii care fuseseră anterior infectaţi cu virusul vaccinal sunt imuni. Virusul variolei (smallpox) şi virusul vaccinal (cowpox) sunt înrudite biochimic şi induc o stare de imunitate încrucişată. Probabil, ele au origine comună, dar s-au adaptat la gazde diferite.

Debutul imunologiei ca ştiinţă este greu de precizat. N. K. Jerne (1977) propune următoarele etape:

1) Perioada aplicaţiilor practice este premergătoare stabilirii cadrului conceptual al Imunologiei. Etapa este ilustrată de descoperirile lui Pasteur cu aplicaţie practică fundamentală. Este perioada marilor descoperiri ale vaccinurilor. Denumirea de „vaccin" a fost dată de Pasteur în amintirea produsului recoltat de Jenner din leziunile de pe ugerul vacii şi s-a păstrat pentru toate produsele utilizate în scopul creării unei stări de rezistenţă preventivă faţă de eventualul contact cu agentul patogen. Pasteur a fundamentat ştiinţific practica producerii şi utilizării vaccinurilor. El a demonstrat că proprietăţile biologice (patogenitatea şi virulenţa) agenţilor infecţioşi nu sunt fixe, ci se pot modifica în anumite condiţii: pot fi diminuate prin anumite artificii de tehnică, astfel încât virulenţa unui agent care determină infecţii grave poate fi atenuată şi agentul poate să producă o infecţie uşoară, fără semne clinice, dar care creează o rezistenţă foarte solidă. Pasteur a realizat atenuarea virulenţei bacteriilor prin două metode: prin îmbătrânirea culturilor şi prin cultivarea la temperaturi ridicate.

Etapa descriptivă corespunde perioadei 1890–1930 şi este marcată de descoperirea fagocitozei de către Metchnikoff (1890–1910) şi de punerea bazelor imunităţii celulare. În acelaşi timp, Behring şi Kitasato (1890) au evidenţiat existenţa anticorpilor şi au pus bazele conceptului de imunitate humorală. Ehrlich (1900) a formulat teoria lanţurilor laterale cu privire la anticorpogeneză, anticipând descoperirea fenomenelor de recunoaştere a substanţelor nonself şi a receptorilor celulari şi a evidenţiat faptul că organismele nu produc anticorpi faţă de constituienţii celulari proprii (horror autotoxicus). Landsteiner (1914) a descris existenţa sistemului grupelor sanguine ABO şi implicaţiile lui în practica transfuziilor.

Ramon (1925) a demonstrat că unii agenţi patogeni (difteric, tetanic) produc toxine foarte puternice. În anumite condiţii, toxinele îşi pierd proprietăţile toxice şi pot fi injectate fără să determine stări patologice, dar îşi păstrează capacitatea de a imuniza.

În 1894, Pfeiffer a descris fenomenul de bacterioliză, mediată de anticorpii specifici şi de complementul din serul normal de cobai.

Etapa elucidării structurii moleculare a antigenelor şi anticorpilor este dominată de un spectru larg al cercetărilor de biochimie. Studiile cu ajutorul antigenelor artificiale au clarificat proprietăţile substanţelor imunogene şi au demonstrat capacitatea organismului de a produce anticorpi faţă de substanţe chimice care nu se găsesc în natură.

Etapa descoperirii mecanismelor celulare (1950–1970) este marcată de progresele biologiei moleculare şi de interferenţa cu Virologia, Biologia celulară, Biofizica, Biochimia, Genetica. S-a evidenţiat rolul esenţial al limfocitului în fenomenele imunitare, precum şi mecanismele sintezei şi secreţiei anticorpilor de către plasmocit. McFarlane Burnet (1958) a elaborat teoria selecţiei clonale, ca mecanism celular fundamental al elaborării răspunsului imun specific. J.F.A.P. Miller (1960) a stabilit rolul esenţial al timusului în procesul de maturare a sistemului imunitar. Timusul este un organ imunocompetent care condiţionează diferenţierea şi maturarea funcţională a limfocitelor T. Miller şi Good (1961) au evidenţiat rolul bursei lui Fabricius în geneza sistemului imunitar la păsări.

J. Dausset (1958) a demonstrat că pe suprafaţa celulelor oricărui organism se găsesc o serie de molecule (antigene), care conferă fiecărui organism o „personalitate antigenică" unică. Datorită acestor molecule, grefa evoluează spre respingere, cu atât mai rapid cu cât, între organismul donor al grefei şi cel receptor, diferenţele genetice sunt mai accentuate. Antigenele suprafeţei celulare, denumite antigene de histocompatibilitate conferă individualitate biochimică inconfundabilă fiecărui organism.

Etapa sistemică (după 1970) corespunde unei abordări integratoare, de analiză structurală a întregului sistem imunitar. După opinia lui Jerne (1985) „imunologia şi-a pierdut statutul de disciplină izolată, fiind pe cale de a fi absorbită de biologia clasică". Realizările acestei etape sunt extrem de numeroase:

– cunoaşterea amănunţită a celulelor sistemului imunitar (morfologie, origine, dezvoltare ontogenetică, distribuţia tisulară, recircularea etc.);

– heterogenitatea funcţională a diferitelor tipuri de limfocite T: Th, Tc, Ts, Ta, T_{DH};

– identificarea markerilor fenotipici de suprafaţă;

– interacţiunile dintre diferitele tipuri şi subpopulaţii celulare;

– bazele moleculare ale fenomenelor de recunoaştere;

– descoperirea receptorului de antigen al celulelor T şi a fenomenului de recunoaştere asociată;

– mecanismul activării limfocitelor T şi B;

– structura genetică a complexului major de histocompatibilitate (CMH), cu rol esenţial în elaborarea răspunsului imun;

– descrierea structurii chimice a antigenelor de histocompatibilitate;

– stabilirea bazelor genetice ale enormei diversităţi a anticorpilor;

– descrierea nivelelor de heterogenitate a anticorpilor;

– realizarea tehnologiei hibridomului şi producerea anticorpilor monoclonali, cu uniformitate perfectă pentru un singur antigen;

– descoperirea interleukinelor, leucotrienelor şi a rolului lor;

Această ultimă etapă corespunde, în planul nivelului de abordare, imunologiei moleculare.

Spectrul cercetării imunologice s-a extins şi s-a aprofundat, dar în acelaşi timp domeniul imunologiei este mai unificat, sub imperativul comun al explicaţiilor la nivel molecular.

După ce vor fi mai bine înţelese aspectele legate de determinismul genetic al răspunsului imun, diferenţierea limfocitelor, mecanismele moleculare ale funcţiilor lor va fi posibilă utilizarea cunoştinţelor în prevenirea maladiilor cu substrat imun, în prevenirea respingerii grefelor şi în controlul imunologic al malignităţilor.

Imunologia este o ştiinţă de sine stătătoare şi dispune de numeroase date de ordin experimental, cu privire la structura, funcţia şi reglarea activităţii constituienţilor săi. Descoperirile din sfera Imunologiei au restructurat multe concepte ale discipplinelor biologice clasice: histologia, citologia.

DIVIZIUNILE IMUNOLOGIEI

Imunologia s-a născut ca un domeniu al Microbiologiei şi s-a dezvoltat în acest cadru, fiind un domeniu al Bacteriologiei medicale, până aproape de anul 1960. Treptat însă, prin acumularea unui volum mare de date ştiinţifice, care au demonstrat intervenţia funcţiei imunitare şi a reacţiilor imune în numeroase fenomene normale şi patologice, Imunologia a devenit o ştiinţă de sine stătătoare. Mai mult decât atât, din domeniul diversificat al Imunologiei s-au desprins *ramuri*, care la rândul lor tind să aibă o existenţă autonomă. Cea mai cuprinzătoare dintre ramuri este *Imunibiologia*, care abordează aspectele imunitare ca manifestări ale unei funcţii biologice esenţiale – funcţia de apărare. Imunobiologia studiază *substratul biologic* al răspunsului imun (celulele sistemului imunitar, originea şi mecanismele diferenţierii lor, factorii celulari şi humorali ce asigură diferenţierea lor), mecanismele celulare şi moleculare ale *biosintezei anticorpilor*, explică fenomenele imunitare legate de *implantarea celulelor tumorale* şi geneza cancerului. Studiază deasemenea, mecanismele imunitare ale *respingerii grefelor de ţesuturi şi organe*, mecanismele *răspunsului imun în filogenie şi ontogenie*, precum şi bazele celulare şi moleculare ale *manifestărilor de hipersensibilitate* şi ale maladiilor autoimune.

Imunochimia studiază procesele imunitare din punct de vedere biochimic. Preocuparea principală şi primordială a imunochimiei a constat în studiul chimiei antigenelor şi anticorpilor şi al mecanismului lor de interacţiune. Ulterior, imunochimia şi-a lărgit sfera de activitate. Ea se ocupă de studiul factorilor şi moleculelor care intervin în răspunsul imun (în special în răspunsul imun mediat celular): limfokine, antigenele de histocompatibilitate, receptorii de antigen ai celulelor limfoide, precum şi cu studiul biochimic al componentelor complementului.

Imunogenetica studiază determinismul genetic al răspunsului imun, mecanismele genetice ce asigură biosinteza anticorpilor şi cele ce asigură diversitatea antigenelor de histocompatibilitate.

Imunohematologia s-a născut odată cu stabilirea diferenţelor antigenice ale eritrocitelor umane şi cu precizarea existenţei grupelor sanguine (K. Landsteiner, 1901) şi s-a dezvoltat după ce s-a stabilit existenţa unor diferenţe fine între diferite tipuri de eritrocite şi, în special, după descoperirea *factorului Rh* şi a rolului său în patologia sarcinii.

Imunologia medicală umană şi veterinară s-a dezvoltat în 3 direcţii:

– direcţia *profilactică*, orientată pe descoperirea şi producerea unor noi vaccinuri, capabile să creeze o stare de rezistenţă. Ea se preocupă, deasemenea, de schemele de vaccinare, de posibilitatea asocierii diferitelor vaccinuri şi de posibilitatea stimulării răspunsului imun cu ajutorul adjuvanţilor;

– direcţia *terapeutică* studiază posibilitatea obţinerii serurilor imune. Ele conţin anticorpi şi se administrează organismelor care prezintă riscul îmbolnăvirii prin infecţii;

– direcţia *diagnosticului* studiază posibilitatea identificării agenţilor etiologici ai diverselor maladii infecţioase, cu ajutorul reactanţilor imunologici (seruri şi antigene).

Imunopatologia studiază fenomenele imunitare în relaţie cu diferite maladii. În multe situaţii patologice, răspunsul imun (activarea funcţiei imunitare) are efecte defavorabile, prejudiciante asupra organismului. Răspunsul imun se instituie drept cauză şi mecanism pentru producerea unor manifestări patologice. Afecţiunile generate de activarea sistemului imunitar (imunopatiile) se grupează în 3 categorii: 1) *imunodeficienţe primare* (înăscute) şi *secundare* (dobândite); 2) stările de *hipersensibilitate*; 3) maladiile *autoimune*. Imunopatologia studiază, deasemenea, *imunitatea de transplant* şi *imunitatea antitumorală*, răspunsul imun în maladiile infecţioase virale şi bacteriene, precum şi în maladiile parazitare.

Serologia (Imunoserologia) s-a dezvoltat ca o ramură practică, dedicată studiului tehnicilor de explorare a reacţiilor imune *in vitro*.

Capitolul I

CARACTERIZAREA GENERALĂ A ANTIGENELOR

Convenţional şi operaţional, antigenele se definesc ca fiind substanţe străine care, introduse în organismul uman sau animal pe o cale parenterală declanşază producerea de anticorpi, cu care se combină în mod specific.

Definiţia este incompletă din următoarele motive:

1) calea de administrare digestivă nu exclude întotdeauna posibilitatea declanşării răspunsului imun, ci asigură o bună imunizare în cazul unor agenţi infecţioşi care se multiplică în tubul digestiv (vaccinul polio se administrează oral, deşi calea parenterală este mai eficientă);

2) unele substanţe sunt fals considerate ca neantigene, pentru că nu induc reacţii vizibile antigen-anticorp *in vitro*;

3) faţă de unele antigene nu se declanşază răspuns imun, ci se manifestă o stare de toleranţă;

4) unele molecule, ca atare, nu induc un răspunsul imun. Ele activează răspunsul imun numai dacă sunt cuplate covalent cu un suport molecular. Molecula nativă are proprietatea de a se combina specific cu anticorpii astfel formaţi. Acestea se numesc *haptene*.

J. F. Bach (1976) defineşte antigenele ca fiind molecule care, consecutiv introducerii în organism pe o cale adecvată induc un răspuns imun materializat prin proliferarea celulelor limfoide şi sinteza moleculelor de recunoaştere (anticorpi şi receptori celulari) care se combină in vivo şi in vitro cu antigenul inductor.

MODELUL GENERAL DE STRUCTURĂ AL UNUI ANTIGEN

Un antigen este alcătuit dintr-o componentă denumită *„purtător" (carrier)*, care corespunde celei mai mari părţi a moleculei, pe suprafaţa căreia se găsesc subunităţi mici formate din secvenţe specifice de monomeri care se numesc *grupări determinante de specificitate*. Ele conferă individualitatea chimică şi

specificitatea antigenică a moleculei respective. Grupările determinante de specificitate (gds) sunt echivalenţii moleculari ai *haptenei*.

PROPRIETĂŢILE ESENŢIALE ALE ANTIGENELOR

Utilizând moleculele sintetice, M. Sela (1969) a descris două proprietăţi esenţiale ale antigenelor:

1) *Imunogenitatea* (antigenitatea) este proprietatea unui antigen complet, format din gruparea *carrier* şi *epitopi*, de a declanşa un răspuns imun ori de câte ori pătrunde în organism. Această proprietate este asociată cu gruparea carrier a moleculei, grupare care influenţează într-o oarecare măsură specificitatea anticorpilor sintetizaţi;

2) *Specificitatea* este definită de capacitatea antigenului (sau a unor mici regiuni ale moleculei sale) de a se combina în mod strict specific cu anticorpii sau cu receptorii celulari a căror sinteză a indus-o, ori de câte ori vine în contact cu aceştia. Specificitatea este dependentă, în primul rând, de epitopi (g d s), dar este influenţată într-o oarecare măsură de gruparea carrier.

CLASIFICAREA ANTIGENELOR

După originea lor, antigenele sunt *exogene* şi *endogene*.

Antigenele exogene sunt cele mai numeroase şi pot fi împărţite în 3 categorii: 1) *naturale*; 2) *artificiale*; 3) *sintetice*.

Antigene naturale

Antigenele naturale formează categoria cea mai cuprinzătoare. Aici sunt incluse toate macromoleculele de origine naturală (din virusuri, microorganisme, fungi, plante şi animale).

După dimensiuni se disting:

1) Antigene *moleculare* (solubile); proteine, polizaharide, lipide, acizi nucleici;

2) Antigene *corpusculare* (insolubile): virusuri, celule (bacterii, celule eucariote).

Antigenele *proteice* sunt cele mai numeroase şi cele mai importante. Fiecare moleculă proteică are o structură tridimensională unică determinată de secvenţa de aminoacizi. Antigenitatea este o proprietate comună atât proteinelor structurale (mioglobină, albumină, proteine ale capsidei virale etc.), cât şi celor funcţionale: enzime şi hormoni. Toate proteinele şi polipeptidele cu o g m mai mare de 1000 D sunt imunogene într-o măsură mai mare sau mai mică.

În cazul antigenelor proteice nu se poate delimita componenta moleculară carrier de grupările inductoare ale răspunsului imun (epitopi). Există posibilitatea

ca o anumită regiune a moleculei, în anumite condiţii experimentale, să aibă rolul de purtător, iar alteori să se comporte ca epitop. De aceea M. Sela a recomandat utilizarea termenului de *grupare imunodominantă*.

După intensitatea răspunsului imun pe care-l declanşază, se disting antigene *puternice* şi *slabe*.

Imunogenitatea proteinelor se modifică sub acţiunea unor factori fizici (căldura) sau chimici (care determină schimbări conformaţionale). Hidroliza enzimatică modifică imunogenitatea proteinelor în diferite grade. Formaldehida nu modifică imunogenitatea, dar anulează activitatea biologică a proteinelor (toxinele îşi pierd proprietăţile toxice, dar rămân imunogene).

Enzimele sunt antigenice indiferent de originea lor. După combinarea cu anticorpii specifici faţă de situsul activ, enzima îşi pierde activitatea datorită modificării conformaţionale a moleculei. Dacă gds sunt situate în afara situsului catalitic, activitatea enzimei este parţial inhibată sau rămâne intactă. Foarte rar, complexul enzimă–anticorpi are un efect catalitic superior.

Hormonii sunt molecule slab imunogene, datorită uniformităţii relative a structurii lor chimice în regnul animal. Anticorpii specifici se obţin prin asocierea lor prealabilă cu adjuvantul Freund.

Polizaharidele sunt molecule slab imunogene. Antigenitatea lor este conferită de succesiunea unităţilor componente şi de configuraţia spaţială a moleculei. Din punctul de vedere al structurii moleculare se disting două tipuri de polizaharide: a) cele care au o catenă centrală, pe care se inseră ramificaţiile laterale; b) cele ce nu au o catenă centrală, iar ramificaţiile sunt dispuse fără nici-o simetrie. Rolul catenelor centrale în imunogenitate este controversat, dar ramificaţiile au o deosebită importanţă pentru determinarea specificităţii antigenice a polizaharidelor.

De cele mai multe ori, polizaharidele se comportă ca *haptene*, adică devin antigenice după cuplarea cu un purtător *proteic*, dar au proprietatea de specificitate, adică se combină cu anticorpii complementari faţă de complexul glicoproteic.

Se cunosc determinanţii antigenici ai glicoproteinelor cu specificitate de grup sanguin în sistemul ABO. Aceste glicoproteine se găsesc nu numai pe suprafaţa hematiilor şi în ţesuturi, dar şi în secreţiile exocrine (salivă, suc gastric) la 75% dintre indivizi. Sunt molecule hidrososolubile şi studiul lor a fost mult mai uşor decât al moleculelor de pe suprafaţa hematiilor.

Carbohidraţii glicoproteinelor eritrocitare au rol dominant în determinarea specificităţii de grup sanguin, aşa cum a reieşit din studiile de digestie enzimatică controlată. Specificitatea antigenică de grup A este conferită de N-acetilgalactozamină. Cea de grup B este datorată galactozei, iar specificitatea de grup O(H) este o funcţie a fucozei.

Polizaharidele structurale ale capsulei celulei bacteriene sunt antigenice.

Dextranii sunt polimeri de glucoză sintetizaţi extracelular de unele bacterii lactice. Au greutăţi moleculare foarte diferite, în funcţie de gradul lor de polimerizare. Nu sunt imunogeni şi de aceea se folosesc ca înlocuitori ai plasmei. Prin transfuzii repetate cu soluţii de dextran, la om s-au obţinut anticorpi antidextran. Modul de legare a unităţilor de glucoză (1 → 2, 1 → 3, 1 → 4, 1 → 6) creează diferenţe de ordin chimic între diferitele tipuri de dextrani. Acestea pot genera diferenţe de specificitate antigenică.

Acizii nucleici, în stare purificată sunt molecule neimunogene datorită uniformităţii lor structurale în lumea vie. Asocierea lor cu proteine de legare (în ribosomi, sau legarea ADN fagic cu proteinele capsidale) sau cu polizaharide le conferă imunogenitate. Anticorpii sintetizaţi sub acţiunea conjugatelor se combină cu acidul nucleic pur. Acidul nucleic se comportă ca haptenă, iar anticorpii sunt lipsiţi de specificitate. De exemplu, serurile imune anti–ARN reacţionează cu orice preparat de ARN pur, indiferent de originea sa. Acizii nucleici, *in vitro* şi *in vivo* interacţionează nespecific cu numeroase proteine şi le conferă o nouă specificitate antigenică.

Lipidele sunt neimunogene, dar se pot cupla cu proteinele şi se comportă ca haptene. O haptenă lipidică cu o importanţă practică deosebită este *cardiolipina* din cordul mamiferelor. În serul indivizilor infectaţi cu *Treponema pallidum* se găsesc anticorpi, care, *in vitro* se combină cu cardiolipina (reacţie încrucişată) înalt purificată, extrasă din cordul bovin.

Antigenele corpusculare. Proteinele şi glicoproteinele învelişurilor *virale*, ca şi cele expuse pe suprafaţa celulelor infectate, sunt imunogene şi au rol în declanşarea răspunsului imun al gazdei.

Antigenele *bacteriene* sunt fie *solubile* (eliminate în mediul extracelular), fie *corpusculare* (legate de corpul celulei). Din prima categorie fac parte *exotoxinele,* iar din cea de a II-a, antigenul somatic (care corespunde endotoxinei bacteriilor Gram negative), antigenul polizaharidic capsular, flagelina, pilina, mureina etc.

Antigenele *eritrocitare*, sunt glicoproteine ale suprafeţei eritrocitelor, cu determinism biochimic bine cunoscut. Ele conferă specificitatea de grup în sistemul ABO (ABH) şi condiţionează regulile generale ale transfuziei de sânge. Se numesc şi antigene ABH, deoarece antigenul H se găseşte pe eritrocitele de grup O şi în cantitate progresiv descrescândă pe hematiile de grup A, B şi AB.

Antigenele de *histocompatibilitate* (descrise de J. Dausset, 1958) se găsesc pe suprafaţa celulelor din majoritatea ţesuturilor fiecărui organism şi conferă individualitate chimică proprie fiecărui individ uman şi animal. Se numesc şi antigene de *transplantare*, deoarece, antigenele respective, după transplantarea

celulelor la un organism receptor se comportă ca antigene şi sunt răspunzătoare de respingerea grefelor, prin declanşarea răspunsului imun. Antigemele de histocompatibilitate se evidenţiază prin reacţia de respingere a grefelor tisulare. În funcţie de raportul genetic dintre donor şi receptor, antigenele de histocompatibilitate aparţin următoarelor categorii:

1) *autoantigenele* includ antigenele proprii de histocompatibilitate, care în condiţii normale sunt tolerate de sistemul imunitar. Antigenele de histocompatibilitate sunt molecule cu caracter strict individual. Sub acţiunea unor factori fizici şi chimici se modifică, devin antigene şi generează maladiile autoimune;

2) *izoantigenele* cuprind antigenele de transplantare comune organismelor identice din punct de vedere genetic, care aparţin unei linii genetic pure (inbred). Verificarea purităţii genetice a unei populaţii de organisme se face prin transplantul de piele. Dacă grefa este acceptată, organismele respective aparţin aceleiaşi linii (inbred). Termenii „izoantigen" şi „inbred" nu au corespondenţă pentru populaţia umană;

3) *aloantigenele* (alos = altul) includ moleculele celulare, care, după injectare declanşază răspunsul imun la organisme ale aceleiaşi specii, dar neidentice genetic cu organismul donor. Aloantigenele sunt inegal răspândite la indivizii unei specii şi induc răspunsul imun la organismele care nu posedă antigenul respectiv. Aloantigenele se evidenţiază după imunizarea unui organism cu celule provenite de la organisme ale aceleiaşi specii, dar aparţinând unui alotip diferit;

4) *heteroantigenele* (xenoantigene, xenos = străin) includ molecule care se găsesc în/pe celulele tuturor indivizilor unei specii şi care se comportă ca antigene faţă de organismele altei specii. Aceste antigene se evidenţiază prin imunizarea unui organism, cu celule provenite de la un organism al unei specii diferite. Un astfel de preparat aduce în organismul receptor, nu numai heteroantigene, ci şi aloantigene şi chiar autoantigene. Injectarea unui astfel de preparat este una dintre cele mai utilizate metode pentru a induce experimental sinteza autoanticorpilor.

Antigenele de organ sunt rezultatul particularităţilor biochimice ale diferitelor categorii de celule din alcătuirea unui organ. Antigenele cu specificitate tisulară conferă o anumită marcă biochimică diferitelor organe. De exemplu, proteinele din glanda mamară diferă de proteinele ţesutului renal al aceluiaşi organism.

Antigenele tumorale sunt antigene de transplantare, anormale, cu imunogenitate redusă. Orice structură chimică a celulei maligne, absentă în/pe celulele sănătoase ale ţesutului de origine a tumorii, susceptibilă de a induce o reacţie imunitară, fie la gazdă, fie la un alt organism poate fi considerată antigen tumoral.

După malignizare, suprafaţa celulară este cea mai modificată. Semnalele reglatoare de control al creşterii şi multiplicării, care acţionează în primul rând la nivelul membranei, nu-şi găsesc ţinta structurală şi comportamentul celular se schimbă. Lipsa inhibiţiei de contact este cea mai evidentă dintre modificările celulei maligne.

Se disting 4 clase de antigene tumorale.

1) antigenele *oncofetale* se găsesc pe suprafaţa celulelor tumorale, dar şi a celulelor normale în timpul unei faze de diferenţiere embrionară. Nu se găsesc pe suprafaţa celulelor organismului adult, sau se găsesc în cantităţi foarte mici. Antigenele de suprafaţă ale celulei tumorale, descrise ca antigene de transplantare specific tumorale (TSTA = *t*umour *s*pecific *t*ransplantation *a*ntige*n*) sunt, probabil, sintetizate în interiorul celulei şi transportate la periferie, ca şi antigenele normale de transplantare. Ele se găsesc pe suprafaţa celulelor maligne, dar pot trece şi în fluidele organismului, devenind astfel foarte importante pentru serodiagnosticul stărilor neoplazice.

Aceste antigene au fost purificate şi s-au obţinut antiseruri specifice.

Antigenul *carcinoembrionar* (CEA) a fost izolat de la un pacient cu tumoră de colon. CEA este o glicoproteină de suprafaţă a celulelor normale ale tractului digestiv al fătului. Se găseşte pe celulele maligne ale tractului digestiv uman (intestin subţire, pancreas, ficat, stomac, colon) şi pe celulele normale ale organelor fetale. CEA apare nu numai în ţesutul neoplazic, ci şi în sângele a 60–80% dintre pacienţii cu tumoră de colon, precum şi la pacienţii cu ciroză alcoolică a ficatului sau cu insuficienţă renală.

Alfa fetoproteina (AFP) este o α–globulină normală a sângelui fetal uman şi dispare la o săptămână după naştere. La adult creşte semnificativ în cazul carcinomului hepatic, dar şi a unor tumori cu alte localizări.

Anticorpii specifici anti–CEA şi anti–AFP, marcaţi radioactiv pot permite, *in vivo*, depistarea şi localizarea tumorilor şi chiar a metastazelor.

Antigenul *sulfo–glicoproteic* (o glicoproteină cu sulf) se găseşte în ţesuturile fetale şi s-a izolat din tumori gastrice.

2) Antigenele de *transplantare* (TATA = *t*umour *a*ssociated *t*ransplantation *a*ntigen) sunt detectabile pe suprafaţa celulelor tumorilor induse de carcinogenii chimici. Ele sunt prezente la numeroase tumori experimentale, dar în unele cazuri lipsesc. Demonstrarea prezenţei şi a imunogenicităţii lor necesită studiul imunologic al tumorilor induse la aceiaşi linie inbred. Toate organismele unei linii inbred au antigene de transplantare normale, identice. Demonstrarea indirectă a antigenelor tumorale de transplantare echivalează cu evidenţierea reacţiei de respingere a grefei de ţesut tumoral, de către un organism al aceleiaşi linii inbred, cu cel donor de ţesut tumoral.

Antigenele de transplantare ale tumorilor induse chimic sunt *individuale* pentru fiecare tumoră. Chiar tumorile multiple, induse de acelaşi agent chimic

(metilcolantrenul) în acelaşi ţesut (tegument) al unui organism sunt diferite în ceea ce priveşte antigenele de transplantare. Faptul este explicabil prin diversitatea genelor declanşatoare ale malignizării, care suferă mutaţie sub acţiunea agentului chimic.

Diversitatea antigenică a tumorilor induse chimic este demonstrată experimental: fiecare tumoră stimulează funcţia imunitară a organismului, faţă de antigenele proprii, dar nu faţă de antigenele altei tumori.

Antigenele tumorale de transplantare, ca şi cele normale sunt complexe glicoproteice sintetizate în celulă şi inserate în membrana citoplasmatică. Antigenele tumorilor induse chimic sunt *slabe* sau *puternice*. Tumorile care apar natural sunt slab sau deloc antigenice, ceea ce explică lipsa răspunsului imun şi imposibilitatea detectării lor de către efectorii reacţiilor imunitare.

Nu se ştie dacă antigenele tumorale sunt prezente pe toate tumorile, şi nici dacă celula devine malignă înainte de a da dobândi aceşti markeri distinctivi.

Antigenele tumorale pot fi stabile şi se transmit de la o generaţie celulară la alta. Majoritatea tumorilor trebuie însă considerate heterogene, genetic instabile şi supuse modificărilor calitative şi cantitative ale antigenelor exprimate pe suprafaţa lor.

3) Antigenele celulelor transformate cu *virusuri oncogene ADN* sunt comune tuturor tumorilor, indiferent de natura ţesutului şi de specia organismului gazdă. Toate tumorile induse de un virus dat au antigene comune, chiar dacă ţesutul de origine sau specia purtătoare a tumorii este alta.

Ca localizare, antigenele acestor tumori se găsesc pe suprafaţa celulelor (sunt cele mai importante, deoarece sunt expuse acţiunii efectorilor răspunsului imun) şi în interiorul celulelor (în nucleu sau în citoplasmă). Aceste antigene se disting de antigenele capsidei virale. Ele nu apar în celula transformată, deoarece replicarea virală este blocată.

4) Antigenele asociate celulelor transformate cu *virusuri oncogene ARN* sunt, ca şi cele de mai sus, aceleaşi pentru un virus dat, indiferent de celula gazdă. Majoritatea lor sunt glicoproteine virale care intră în alcătuirea peplosului, ceea ce le deosebeşte net de antigenele induse de virusurile oncogene ADN. Antigenele glicoproteice sunt codificate de gena *env* (envelope). Tumorile induse de virusurile oncogene ARN pot avea antigene comune, a căror sinteză este indusă de un *grup* de virusuri înrudite (antigene specifice de grup) sau antigene specifice de *tip*, codificate de un număr restrâns de virusuri foarte înrudite.

Tumorile induse de virusurile oncogene (ADN şi ARN) se pot transplanta în serie, la organisme inbred sau outbred. Imunizarea prealabilă a organismului cu virusul ARN inactivat inhibă evoluţia grefei tumorale. Ţesutul tumoral grefat este respins ca orice grefă de ţesut normal.

Antigene artificiale

Antigenele artificiale sunt, la origine, antigene naturale, modificate chimic, prin cuplarea – cel mai adesea covalentă – a uneia sau mai multor molecule mici, care le conferă o nouă individualitate antigenică şi o nouă specificitate de combinare cu anticorpii, în raport cu molecula de origine. S-au obţinut 3 tipuri de antigene artificiale, derivate din antigenele proteice, după legarea lor cu diferite haptene:

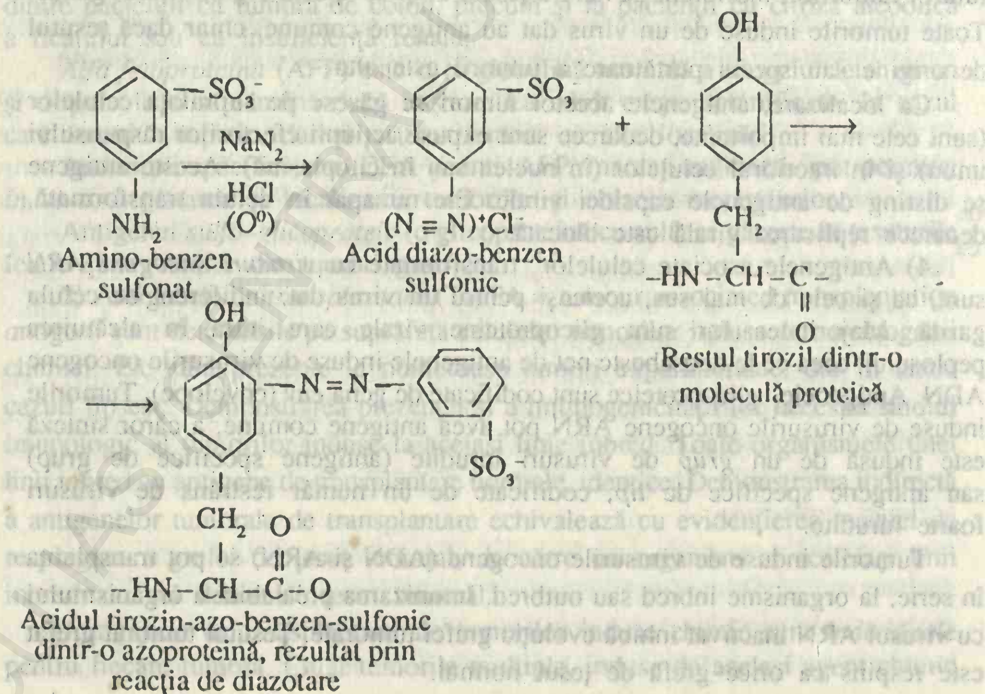
a) conjugate *haptenă–proteină*;

b) conjugate *proteină-proteină*, prin intermediul unor agenţi bifuncţionali de legare (diizocianaţii şi carbodiimidele);

c) *proteine legate de suporturi insolubile*, prin reacţia de diazotare sau prin intermediul carbodiimidelor.

Conjugatele *haptenă–proteină* au fost folosite de Landsteiner în studiile experimentale referitoare la mecanismele răspunsului imun. Haptenele, în moleculele conjugate îndeplinesc rolul de epitopi (grupări determinante de specificitate), iar moleculele proteice au rol de carrier (purtător).

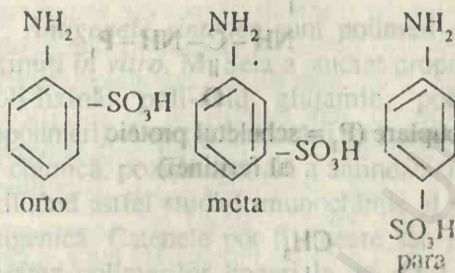
Conjugatele *haptenă–proteină* sunt alcătuite dintr-o haptenă, cuplată covalent cu o proteină. Landsteiner a cuplat amino-benzen-sulfonatul, de molecule proteice, prin reacţia de *diazotare* şi a obţinut *azoproteine*:



După cuplarea haptenei cu tirozina, histidina sau lizina din structura unei proteine rezultă un antigen atrificial, care induce formarea a 3 categorii de anticorpi, cu specificităţi diferite, după cum reacţionează cu haptena, cu molecula purtător sau cu întregul complex azoproteic.

O altă modalitate de a obţine conjugate haptenă-proteină este *iodurarea*. Proteinele puternic iodurate dobândesc o nouă specificitate antigenică. Ele induc formarea anticorpilor care precipită proteinele iodurate heterologe. Aceasta denotă că anticorpii au specificitate faţă de o grupare iodurată, în special faţă de tirozina iodurată, indiferent de gruparea purtător.

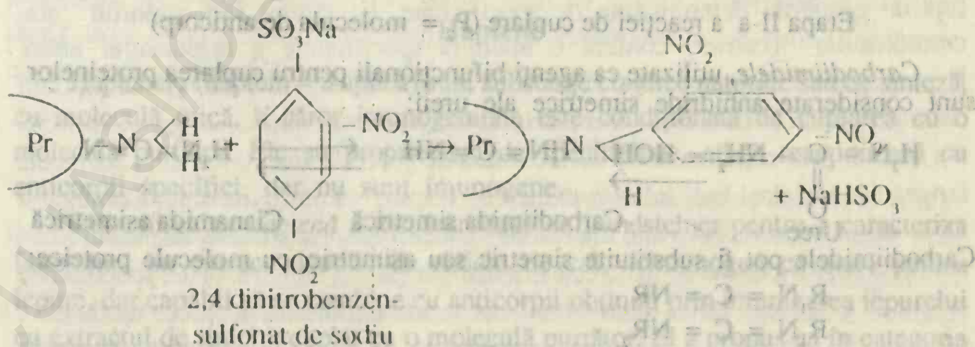
Conjugatele haptenă–proteină au permis studiul influenţei aranjamentului spaţial al haptenei asupra specificităţii antigenice. În acest sens, gruparea sulfonat a haptenei este legată în poziţia orto-, meta- sau para- amino-benzenului. Antiserurile obţinute au specificitate pentru fiecare din derivaţi. Haptenele creează noi grupări determinante de specificitate, după cuplarea cu molecula purtător.



Izomerul sulfonat meta-, al haptenei conjugată cu proteina păstrează capacitatea de a precipita cu anticorpii obţinuţi faţă de proteina nativă, în timp ce izomerii orto- şi para- au afinitate foarte scăzută. Izomerii induc modificări conformaţionale sterice ale grupărilor determinante de specificitate ale antigenului.

O altă reacţie de obţinere a conjugatului haptenă–proteină este cea de *substituţie nucleofilă*. Cele mai folosite haptene sunt 2,4 dinitrofenil (DNP) şi 2,4, 6-trinitrofenil (TNP).

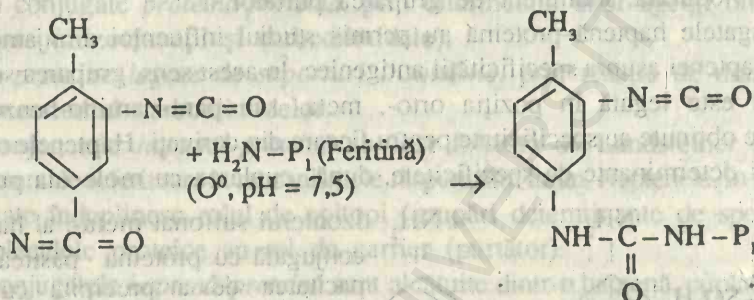
Mecanismul molecular al cuplării este următorul: un atom de H din gruparea OH^-, NH_2^+ sau S – SH a proteinei, este înlocuit de gruparea haptenică prin eliminarea apei:



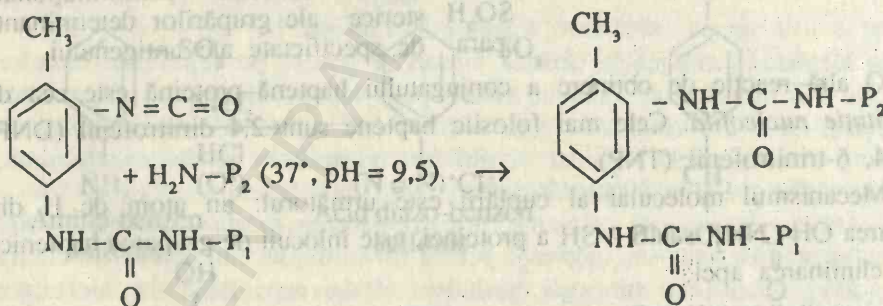
2,4 dinitrobenzen-sulfonat de sodiu

Reacţia dintre proteină şi 2,4 dinitro-benzen-sulfonatul de sodiu ilustrează mecanismul atacului nucleofilic, reacţie în care proteina cedează electroni, iar nucleul benzenic îi acceptă.

Conjugatele *proteină-proteină* se obţin cu ajutorul agenţilor bifuncţionali de legare: diizocianaţii şi carbodiimidele. Deoarece grupările ciano au reactivitate diferită, reacţia de cuplare se realizează în trepte. De exemplu, gruparea din poziţia 4 a toluilen-diizocianatului este mai reactivă decât gruparea din poziţia 2. Acest fapt permite ca mai întâi, în poziţia 4 să se cupleze una dintre proteine, iar ulterior, cuplarea celeilalte în poziţia 2:

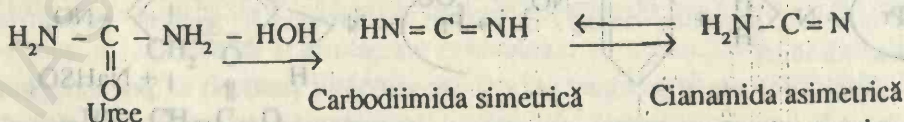


Etapa I a reacţiei de cuplare (P_1 = scheletul proteic al feritinei)



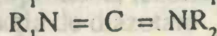
Etapa II-a a reacţiei de cuplare (P_2 = molecula de anticorp)

Carbodiimidele, utilizate ca agenţi bifuncţionali pentru cuplarea proteinelor sunt considerate anhidride simetrice ale ureii:



Carbodiimidele pot fi substituite simetric sau asimetric, cu molecule proteice:





Cu ajutorul agenţilor bifuncţionali de cuplare se pot obţine conjugate proteice cum sunt Ac- feritină, insulină-albumină sau se folosesc ca mediatori ai legării diferitelor molecule proteice de eritrocite.

Conjugatele *proteină-suport insolubil* se obţin prin cuplarea proteinelor cu un suport insolubil, prin reacţia de diazotare, prin intermediul carbodiimidelor sau al BrCN. Ca suporturi insolubile se folosesc derivaţi celulozici: Sephadex, Sepharose etc. Legarea proteinei de suport prin reacţia de diazotare se face prin intermediul tirozinei, lizinei, histidinei, triptofanului, argininei.

Conjugatele anticorpi-suport insolubil (imunosonbenţi) sunt folosite cu o eficienţă deosebită pentru purificarea proteinelor, datorită specificităţii lor de combinare cu anticorpii corespunzători, fixaţi într-o coloană de material inert.

Antigene sintetice

Antigenele sintetice sunt polimeri de aminoacizi, cu secvenţă cunoscută, obţinuţi *in vitro*. M. Sela a studiat proprietăţile antigenice ale homopolimerilor (poli-lizină, poli-acid glutamic, poli-prolină) şi ale heteropolimerilor (copolimeri). Avantajul utilizării lor constă în faptul că se poate modifica compoziţia lor chimică, poziţia spaţială a aminoacizilor, greutatea moleculară a polimerilor, facilitând astfel studiul imunochimic al grupărilor determinante de specificitate antigenică. Catenele pot fi lineare sau ramificate. Cele ramificate rezultă prin ataşarea polimerilor lineari la un miez polifuncţional. Ramificarea se obţine mai uşor cu aminoacizii aromatici.

Homopolimerii nu sunt imunogeni decât cu rare excepţii (poli L-pro, poli L-glu, poli L-arg, poli L-lys). Copolimerii formaţi din doi aminoacizi nu sunt totdeauna imunogeni, iar cei rezultaţi prin polimerizarea a 3 aminoacizi diferiţi sunt imunogeni fără excepţie. Cu cât sunt mai heterogeni în ceea ce priveşte compoziţia lor, cu atât sunt mai imunogeni.

Haptene

Haptenele (haptein = a apuca) sunt substanţe chimice naturale sau de sinteză, cu moleculă mică, a căror imunogenitate este condiţionată de cuplarea cu o moleculă purtător. Ele au proprietatea de specificitate, adică reacţionează cu anticorpii specifici, dar nu sunt imunogene.

Denumirea de *haptenă* a fost introdusă de Landsteiner pentru a caracteriza funcţional un extract alcoolic de rinichi de cal, neimunogen ca atare pentru iepure, dar capabil să se combine cu anticorpii obţinuţi prin imunizarea iepurelui cu extractul de rinichi, cuplat cu o moleculă purtător. El a propus ca în categoria

haptenelor să fie cuprinsă orice substanţă care, în forma sa nativă nu poate să inducă un răspuns imun detectabil, dar care dobândeşte capacitatea imunogenă după cuplarea sa *in vivo* sau *in vitro* cu o moleculă purtător cu greutate moleculară mare. Deoarece sunt neimunogene, dar au specificitate antigenică, haptenele s-au numit *jumătăţi de antigene.*

În general, haptenele sunt molecule mici, deşi uneori macromoleculele pot funcţiona ca haptene. Extractul alcoolic de rinichi este o haptenă complexă. Haptenele simple sunt polinucleotidele, alcoolii, formaldehida etc. Cu ajutorul haptenelor simple, prin reacţii de cuplare s-au obţinut antigenele artificiale. Haptena din complexul molecular are rolul grupării determinante de specificitate. Utilizarea haptenelor a permis determinarea mărimii grupărilor antigenice şi indirect, a mărimii situsului de combinare al anticorpilor.

Cuplarea haptenă-purtător necesită existenţa unei grupări reactive a haptenei, care să se lege covalent cu grupările funcţionale ale purtătorului, dar cu păstrarea integrităţii funcţionale a celor doi reactanţi. Haptenele se pot cupla de purtători foarte diverşi: proteinele naturale (albumina, globulina) care se obţin uşor, sunt solubile, rezistente la denaturare şi imunogene, iar conjugatele haptenă-proteină sunt imunogene. Anticorpii formaţi sunt heterogeni ca specificitate şi reacţionează cu complexul imunogen, cu haptena şi cu determinanţii antigenici ai moleculei purtător. Haptenele se pot cupla, deasemenea, cu copolimerii sintetici de aminoacizi, cu celule (hematii), virusuri (fagi) etc.

Haptenele *autocuplante* sunt substanţe cu greutate moleculară mică, a căror particularitate constă în faptul că, după injectare se combină spontan cu proteinele tisulare şi formează complexe haptenă-proteină, *in vivo*. Ele induc sinteza anticorpilor şi iniţiază maladiile autoimune sau determină procese de hipersensibilitate. Astfel se comportă derivaţii dinitrofenolului substituiţi cu Cl sau F, unii produşi de degradare a peniciliei etc.

Efectul de carrier. Antigenele prezintă o dualitate funcţională evidentă, conferită de faptul că specificitatea răspunsului imun este orientată predominant faţă de grupările determinante de specificitate. La rândul său, suportul macromolecular (carrier) conferă o anumită specificitate a răspunsului imun. Experienţele cu conjugate haptenă-proteină (DNP-proteină) au evidenţiat că suportul carrier, în cazul în care este nonself intensifică răspunsul imun. Antigenul artificial s-a obţinut prin cuplarea DNP cu albumina de şoarece. Injectarea sa la şoarecele izogen (al aceleiaşi linii inbred) induce un răspuns imun foarte slab. Conjugatul DNP-albumină serică bovină, injectat la şoarece stimulează intens răspunsul imun antihaptenă. Răspunsul imun nu este orientat numai faţă de g d s, ci are specificitate şi faţă de gruparea carrier. Fenomenul este foarte important, deoarece modulează proprietăţile de antigen ale unei molecule şi se numeşte *efect de carrier.*

Antigene endogene

Antigenele endogene au originea în componentele celulare şi tisulare-proprii organismului şi sunt de două categorii: 1) antigene *sechestrate* (mascate) şi 2) antigene *alterate*.

Antigenele sechestrate sunt substanţe cu localizare intracelulară şi prin urmare, inaccesibile sistemului imunitar pentru a fi recunoscute în cursul dezvoltării sale ontogenetice. În momentul eliberării lor din celulă sub acţiunea diferiţilor factori (fizici, chimici, biologici) substanţele respective se comportă ca nonself pentru sistemul imunitar al organismului. Alteori există bariere anatomice care separă unele componente chimice ale organismului, de contactul cu sistemul imunitar:

– proteinele cristalinului, în cursul intervenţiilor chirurgicale, după traumatismele care sparg capsula, sau după afecţiunile care permeabilizează cristaloida se compartă ca antigene şi declanşază un răspuns imun anticristalin (pot fi afectate irisul, procesele ciliare şi coroida);

– proteinele spermatice (în situaţii de spermostază) induc sinteza locală de anticorpi în structurile epididimului, care reacţionează cu un antigen al spermatozoizilor şi produc sterilitate de natură autoimună;

– caseina din lapte poate deveni antigen endogen.

Antigenele alterate sunt substanţe normale ale suprafeţei celulare, legate de membrană, care din diferite cauze (uzură fiziologică, acţiunea diferiţilor factori) îşi modifică structura chimică şi devin nonself:

– unele medicamente, după fixarea pe anumite structuri chimice proprii se comportă ca haptene;

– virusurile induc sinteza în celula gazdă, a unor antigene virale, precum şi modificarea componentelor self.

În condiţii normale, aceste antigene sunt neutralizate şi eliminate din organism (Ehrlich în 1900 a formulat conceptul „horror autotoxicus"). În condiţii anormale, activarea răspunsului imun faţă de aceste componente chimice poate avea drept consecinţă maladii severe autoimune, care sunt considerate ca expresia patologică a funcţiei imunitare.

Determinanţii antigenici

Cel mai adesea, antigenele sunt macromolecule complexe sau chiar celule întregi, dar răspunsul imun (după injectarea lor într-un organism) este orientat predominant faţă de porţiuni discrete, strict limitate ale antigenului numite *grupări determinante de specificitate* (gds), *situsuri antigenice*, *determinanţi antigenici*, *epitopi*.

Epitopul este regiunea limitată a antigenului care se combină cu situsul activ al moleculei de anticorp şi determină specificitatea reacţiei antigen-anticorp. Epitopii se corelează cu o mobilitate înaltă a atomilor în molecula proteică. Studiile de cristalografie cu raze X permit identificarea atomilor individuali şi determinarea mobilităţii lor, exprimată în *factori de temperatură atomică.* Factorii de temperatură ridicată se corelează cu regiuni de *mobilitate moleculară înaltă,* (regiuni calde), care necesită cantităţi mici de energie, la temperatura biologică, pentru a trece de la o conformaţie la alta. Invers, regiunile moleculare cu mobilitate atomică redusă au factori termici de valoare mică (regiuni reci) şi necesită o cantitate mai mare de energie pentru schimbarea conformaţiei. Mulţi determinanţi antigenici sunt localizaţi în regiunile calde ale moleculei.

Capacitatea unei regiuni a moleculei de antigen de a funcţiona ca epitop şi de a induce formarea anticorpilor specifici de numeşte *imunopotenţă.*

Mărimea gds s-a apreciat indirect prin determinarea mărimii haptenei capabilă să „umplă" complet situsul de combinare al anticorpului. Reacţia de precipitare a sistemului dextran-antidextran este revelatoare în acest sens. Peste o greutate moleculară prag, dextranul este imunogen şi se obţine ser imun antidextran. În laborator se prepară uşor oligozaharide, cu dimensiuni mici, controlabile. Reacţia de precipitare dextran-antidextran este inhibată progresiv de oligozaharidul de glucoză şi atinge valoarea maximă în prezenţa hexazaharidului. Oligomerul cu 6 resturi de glucoză ar corespunde celui mai bun *ligand* care se cuplează cu anticorpii (ligandul este orice moleculă capabilă să formeze un complex cu o altă moleculă). Heptazaharidul ca şi oligazaharidele cu mai puţin de 6 unităţi de glucoză inhibă mai puţin eficient reacţia de precipitare a sistemului folosit. Aceasta semnifică faptul că epitopul este format la rândul său, din subunităţi, fiecare contribuind la afinitatea (energia) de legare în complexul antigen-anticorp.

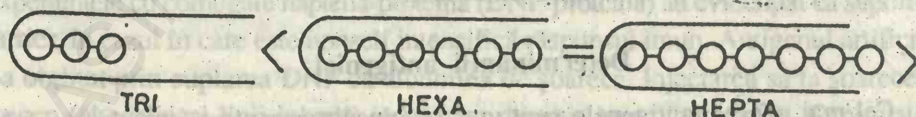


Fig. 1. Reprezentarea schematică a mărimii epitopilor antigenelor polizaharidice. În sistemul dextran-antidextran, oligozaharidul format din 6 resturi de glucoză umple situsul de combinare al anticorpilor specifici. Oligozaharidele mai mici sau mai mari nu se combină eficient cu anticorpii corespunzători (după Goodman, 1984).

Cercetări similare s-au făcut cu homopolimeri de aminoacizi (poli-lys, poli-ala) legaţi de proteine purtător. Serul imun obţinut pe iepure, faţă de aceste conjugate se pune în contact cu haptene de diferite mărimi. Pentamerul de alanină (25 x 11 x 6,5 Å) se leagă cu cea mai mare afinitate de situsul de combinare al anticorpilor. Pentamerul corespunde epitopului antigenic şi reflectă (indirect) dimensiunile situsului de combinare al anticorpilor specifici.

În concluzie, mărimea unui epitop este apreciată la *6–8 subunităţi* pentru polizaharide şi la *4–6 aminoacizi* pentru antigenele proteice.

Valenţa antigenului s-a definit convenţional prin numărul de epitopi prezenţi pe un antigen sau prin numărul moleculelor de anticorpi care pot reacţiona cu o moleclă de antigen. Numărul gds ale unei molecule de antigen variază în raport cu mărimea şi complexitatea sa structurală. Valenţa antigenului se apreciază prin măsurarea cantităţii de antigen şi anticorp dintr-un complex. Studiile *in vitro* l-au condus pe Barret (1974) la concluzia existenţei a două tipuri de valenţe ale antigenului:

–*valenţele funcţionale* sunt conferite de gds aşezate la suprafaţa moleculei de antigen. Numărul lor este proporţional cu greutatea sa moleculară şi se apreciază prin determinarea numărului de molecule de anticorp ce se leagă de antigen. Un situs de valenţă s-ar găsi la fiecare câteva mii de D;

–*valenţele nefuncţionale* sunt conferite de gds interne ale moleculei native. Ele pot deveni funcţionale *in vivo*, după degradarea parţială a moleculei. Numărul total al gds pentru o moleculă nu se cunoaşte. Se pot identifica după degradarea enzimatică parţială a antigenului. Albumina serică bovină nativă are 6 situsuri de valenţă. După scindarea enzimatică se eliberează 9 fragmente peptidice, fiecare din ele precipitând cu serul anti-albumină nativă. Reacţia de precipitare necesită cel puţin două gds, ceea ce înseamnă că molecula nativă conţine cel puţin 18 gds, care *in vivo* devin funcţionale după degradarea parţială a moleculei şi toate induc sinteza de anticorpi specifici.

În evaluarea experimentală a numărului de valenţe ale unui antigen trebuie ţinut seamă de faptul că molecula de anticorp este bivalentă şi că un antiser nu conţine totdeauna anticorpi faţă de toţi determinanţii antigenului.

Antigene heterofile

Antigenele heterofile sunt substanţe neindentice, înrudite chimic, prezente la numeroase specii de animale şi plante. Aceste antigene dau reacţii încrucişate: anticorpii induşi de un antigen al grupului heterofil reacţionează cu oricare din antigenele grupului.

Prototipul antigenelor heterofile este antigenul *Forssman* (descoperit în 1911) din ţesuturile de cobai, dar prezent şi în ţesuturile de cal, pisică, şoarece, balenă, păsări domestice, broască ţestoasă, precum şi pe suprafaţa hematiilor de ovine. Lipseşte la iepure şi de aceea serul imun anti-antigen Forssman se obţine prin imunizarea acestor animale. Anticorpii faţă de antigenul Forssman aglutinează hematiile de berbec şi în prezenţa complementului le lizează. Antigenul

Forssman s-a găsit în celulele unor bacterii patogene (*Streptococcus. pneumoniae, Shigella* sp., *Salmonella* sp.) şi chiar în celulele microbiotei din tractul digestiv, ceea ce explică prezenţa anticorpilor naturali anti-hematie de berbec, în serul uman.

Cele mai multe antigene heterofile sunt *polizaharide*, cu funcţia de haptene în moleculele glicoproteice. Componentele polizaharidice ale antigenelor heterofile sunt foarte asemănătoare în ceea ce priveşte structura lor chimică, chiar dacă aparţin unor organisme foarte diferite: microorganisme, plante, animale. Asemănările structurii chimice a acestor substanţe explică reacţiile imunologice încrucişate. Polizaharidele antigenelor tip Forssman, în stare purificată nu induc formarea anticorpilor. Sunt rezistente la fierbere şi autoclavare.

Antigene timodependente şi timoindependente

Cele mai multe antigene stimulează producerea anticorpilor printr-un mecanism de cooperare dintre limfocitele T şi B: proteinele heterologe, polipeptidele sintetice formate din L-aminoacizi, hematiile heterologe, flagelina monomeră. Acestea sunt antigene *timodependente*. Ele trebuie să aibă cel puţin două tipuri de epitopi, deoarece studiile cu antigene sintetice au evidenţiat că limfocitele T şi B interacţionează cu epitopi diferiţi ai moleculei de antigen. Antigenele timodependente au un număr mic de epitopi de acelaşi fel şi din această cauză nu pot stimula eficient celulele B, necesitând cooperarea celor două feluri de celule.

Antigenele *timoindependente* declanşează răspunsul imun prin activarea directă a celulelor B, fără cooperarea limfocitelor T helper. Ele determină sinteza de anticorpi la fel de intens, la şoarecele normal ca şi la şoarecele nud (cu aplazie timică congenitală, fără celule T): polizaharidul de pneumococ, lipopolizaharidele bacteriene, dextranii, levanii, flagelina polimerizată, polivinilpirolidona.

Antigenele timoindependente au 3 proprietăţi: 1) prezintă în structura lor chimică secvenţe repetitive, dar această condiţie nu este suficientă pentru calitatea de antigen timoindependent, deoarece polimerii sintetici ai L-aminoacizilor, cu secvenţe repetitive sunt antigene timodependente; 2) au o structură tridimensională care ar favoriza interacţiunea directă cu receptorii celulelor B şi ar declanşa răspunsul imun; 3) rezistenţa la acţiunea enzimelor degradative şi persistenţa îndelungată în organism.

Cele două categorii de antigene nu sunt strict delimitate în ceea ce priveşte mecanismul activării răspunsului imun. Antigenele timoindependente, după degradarea structurilor repetitive devin timodependente; glucagonul (antigen timodependent) după scindare cu tripsină eliberează doi determinanţi

antigenici; cel de la capătul N-terminal activează celulele B, iar cel de la capătul C-terminal stimulează celulele T.

FACTORII CARE CONDIŢIONEAZĂ IMUNOGENITATEA

Definiţia dată antigenelor nu este satisfăcătoare deoarece se referă la acţiunea lor (declanşază sinteza anticorpilor şi se combină cu ei). Definiţia completă a unui antigen rezultă din însumarea unui şir de proprietăţi care condiţionează imunogenitatea, deduse în cea mai mare parte prin studii experimentale folosind antigene artificiale şi sintetice. Imunogenitatea este condiţionată de următorii factori:

1) *Caracterul străin* al moleculei. O macromoleculă este cu atât mai imunogenă, cu cât este mai diferită de componentele omologe ale organismului receptor. Caracterul străin nu se referă în primul rând la poziţia taxonomică a celor două organisme (donor şi receptor de antigen), ci în special la structura moleculară a antigenului. De exemplu, hemoglobina de cal este foarte asemănătoare cu cea de iepure şi nu este imunogenă, dar celelalte proteine de cal sunt imunogene pentru iepure.

Caracterul străin (nonself) nu implică existenţa unor molecule cu totul noi, neîntâlnite în organismul receptor, ci presupune numai modificări minime ale moleculei generate de prezenţa unuia sau câtorva aminoacizi diferiţi în anumite poziţii ale secvenţei de aminoacizi ai unei proteine, care în rest este similară sau chiar identică cu proteinele proprii.

Majoritatea proteinelor unei specii sunt nonself pentru alte specii, dar adesecori, la specii diferite se găsesc proteine înrudite chimic.

De regulă, proteinele apărute primele în evoluţie, au un grad superior de asemănare chimică şi sunt slab imunogene pentru speciile înrudite (de exemplu albumina serică), iar cele apărute mai târziu sunt mult mai imunogene (globulinele serice). După modificare chimică, proteinele proprii devin imunogenice (albumina serică de iepure, după acetilare *in vitro* devine antigenică pentru organismul donor).

2) *Mărimea moleculei*. Nu există o limită inferioară netă a mărimii pentru antigenitatea unei molecule, dar imunogenele bune sunt mai mari de 10.000 D. Cu cât o moleculă este mai mare, cu atât numărul epitopilor săi este mai mare. Secvenţele de aminoacizi cu rol de epitopi se repetă de un număr mai mare de ori într-o moleculă mai mare. Proteinele mari (ovalbumina – 40 kD, albumina serică – 70 kD, hemocianina – 6000 kD) sunt foarte imunogene. Proteinele cu moleculă mică (insulina – 5,7 kD, histonele – 6 kD, glucagonul – 3485 D) sunt mai puţin imunogene. Polipeptidele sintetice sunt imunogene dacă au

4,5 kD. Glucagonul este cea mai mică moleculă naturală față de care s-au obținut anticorpi, iar cea mai mică moleculă sintetică imunogenă este un polipeptid de 1400 D.

Un polizaharid, pentru a fi imunogen trebuie să aibă anumite dimensiuni limită. Dextranii sunt antigenici dacă au peste 50 kD, deși există mari variații de răspuns de la o specie la alta (omul și șoarecele răspund bine, cobaiul – foarte puțin). La mărimi egale, polizaharidele naturale alcătuite dintr-un număr mic de monoglucide sunt antigene slabe față de proteine, care au o mare diversitate de monomeri.

Moleculele mici neantigenice, sau slab imunogene pot deveni antigene foarte bune după adsorbția pe particule de colodiu, caolin, cărbune, deoarece le asigură creșterea taliei moleculare.

3) *Complexitatea moleculară.* Dimensiunile mari ale unei molecule nonself nu sunt suficiente pentru a-i conferi calitatea imunogenă. De exemplu, poliacril-amida, nylonul sunt molecule foarte mari, (polimeri sintetici) formate dintr-un număr mare de monomeri legați repetitiv, dar nu au complexitate moleculară.

Cele mai multe macromolecule naturale, în special proteinele sunt complexe deoarece posedă grupări moleculare diverse. De exemplu, mioglobina (proteină globulară cu 153 aminoacizi) are cel puțin 4 epitopi, deoarece după hidroliză cu tripsină rezultă 4 peptide și fiecare dintre ele inhibă reacția de precipitare dintre proteina nativă și antiserul complementar (omolog). Lizozimul (o catenă de 129 aminoacizi) are doi epitopi majori. După scindarea enzimatică a albuminei serice umane rezultă câteva fragmente peptidice care dau, (fiecare în parte) reacție de precipitare cu antiserul omolog față de proteina nativă. În cazul proteinelor globulare (albumina), cea mai mare parte a suprafeței moleculare accesibile este potențial imunogenă și constă dintr-un continuum de epitopi multipli care se suprapun.

Diferențele de specificitate antigenică ale unor proteine înrudite, cu aceiași structură peptidică și care îndeplinesc aceleași funcții sunt date de micile deosebiri de secvență a aminoacizilor, care se comportă ca epitopi imunodominanți.

Homopolimerii sintetici, de regulă, nu sunt imunogeni. Copolimerii formați din doi aminoacizi pot fi imunogeni pentru unele specii (iepure), dar nu pentru altele (om, șoarece). Polipeptidele formate din 3–4 aminoacizi diferiți sunt imunogene pentru toate speciile, ceea ce denotă necesitatea unui grad minim de complexitate chimică pentru manifestarea proprietății de imunogenitate. Complexitatea unei molecule nu depinde numai de diversitatea monomerilor, ci și de secvența lor și de efectul acesteia asupra structurii secundare, terțiare

şi quaternare. Aşa se explică antigenitatea mult mai accentuată a proteinelor în raport cu a polizaharidelor naturale, a lipidelor sau a acizilor nucleici.

4) *Starea fizică a antigenului.* Imunogenitatea este condiţionată de o anumită *rigiditate* a structurii epitopilor. Lipsa ei ar explica imunogenitatea redusă a gelatinei, o proteină denaturată bogată în glicocol (21–35%), derivată din hidroliza colagenului. Rotaţia liberă a peptidelor apare numai între Cα şi gruparea peptidică. Glicocolul nu are ramificaţii (în poziţia α) ceea ce face ca molecula de gelatină să aibă rotaţii libere în jurul axului longitudinal, fără să aibă o configuraţie fixă. Are foarte puţini aminoacizi aromatici (tir, his) şi lipsesc cisteina şi triptofanul.

Legarea L-tir (în proporţie de 2%) îi măreşte imunogenitatea şi induce formarea anticorpilor, care precipită gelatina nativă. Legarea L-tir în proporţie de 10% determină sinteza anticorpilor specifici faţă de gruparea tirozil, pentru care gelatina se comportă ca lanţ purtător. Se consideră că polipeptidul L-tir măreşte rigiditatea moleculei de gelatină. Dar nu totdeauna prezenţa aminoacizilor aromatici într-o moleculă şi nici configuraţia sa stabilă nu sunt condiţii suficiente pentru imunogenitate.

5) *Solubilitatea.* Necesitatea solubilităţii unui antigen este sugerată de următoarele observaţii:

– polimerii macromoleculari sintetici, care nu pot fi solubilizaţi sunt lipsiţi de imunogenitate;

– organismele cu echipamente enzimatice hidrolitice mai active (şoarece) elaborează un răspuns imun mai amplu faţă de antigenele greu solubile (polizaharidul de pneumococ), în raport cu organismele care hidrolizează mai greu (iepure);

– copolimerii D-aminoacizilor nenaturali se degradează lent şi nu sunt antigenici;

– antigenele corpusculare (virusuri, celule) devin antigenice după solubilizarea şi eliberarea componentelor imunogene în macrofage, unde are loc degradarea menajată a antigenului;

– serul imun anti-albumină serică bovină precipită cu fiecare din cele 9 fragmente peptidice rezultate din hidroliza sa, ceea ce denotă că molecula, *in vivo* este scindată şi se relevă epitopi interni faţă de care se sintetizează anticorpi.

Hidroliza enzimatică a moleculei nonself nu este totdeauna o condiţie prealabilă a imunogenezei sale. Studiile cu antigene sintetice au arătat că în momentul recunoaşterii de către celulele sistemului imunitar, epitopii sunt intacţi, identici cu aceia ai moleculei native. Epitopii de suprafaţă ai moleculei sunt foarte imunogeni, iar cei interni sunt puţin imunogeni. Dacă macromolecula ar fi hidrolizată înainte de etapa recunoaşterii, epitopii interni ar avea o imunogenitate superioară.

Hidroliza este o precondiţie a imunogenităţii în cazul antigenelor corpusculare. Pentru antigenele macromoleculare, epitopii imunogeni par a fi în primul rând, cei expuşi pe suprafaţa moleculei (epitopi funcţionali), dar uneori, după hidroliză, unii epitopi interni devin imunogeni fiind accesibili recunoaşterii imunitare.

6) *Accesibilitatea determinanţilor antigenici.* Studiul antigenelor sintetice sugerează faptul că, pentru ca un epitop să fie imunogen, trebuie să fie expus la suprafaţa moleculei pentru a fi accesibil sistemului imunitar. De exemplu, un polimer de L-lys, cu rol de carrier pentru tripeptidul ala-tir-glu este imunogen. După mascarea epitopilor tripeptidici, cu mai multe lanţuri de poli-ala, molecula este lipsită de imunogenitate. Forma globală a moleculei pare a nu fi un factor critic pentru imunogeneză, dar epitopii trebuie să fie accesibili celulelor care îi recunosc.

7) *Configuraţia spaţială a moleculei.* Plierea spaţială a moleculei de antigen are rol important în determinarea specificităţii sale. Proteinele denaturate reacţionează puţin sau de loc cu anticorpii obţinuţi faţă de forma lor nativă. De exemplu, anticorpii faţă de RN-aza pancreatică bovină nativă nu reacţionează cu molecula oxidată cu acid performic căreia îi lipsesc legăturile S-S. Invers, anticorpii faţă de RN-aza oxidată nu reacţionează cu proteina nativă. Modificarea conformaţiei moleculare prin suprimarea legăturilor S-S determină pierderea epitopilor conformaţionali. Conformaţia spaţială presupune o aranjare particulară a atomilor săi.

Numeroase experienţe sugerează că cel puţin uneori, anticorpii recunosc forma globală, tridimensională a unui determinant antigenic, şi nu o anumită secvenţă chimică din structura sa. Acest fapt a reieşit din studiul răspunsului

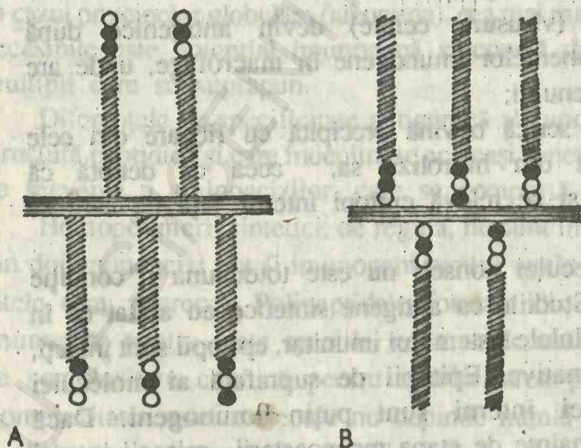
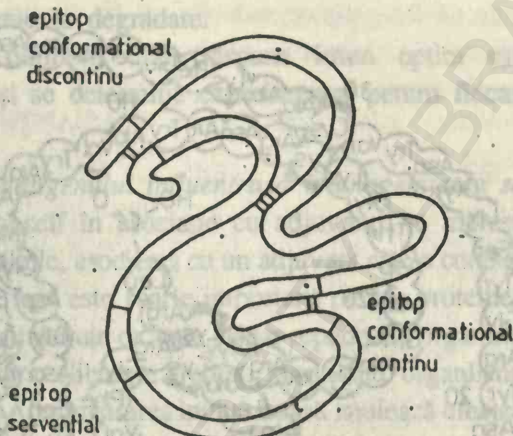


Fig. 2. Imunogenitatea este condiţionată de accesibilitatea epitopilor. A. Resturile de tirozină şi acid glutamic, legate la catanele laterale de poli-D, L-alanină-poli-L-lizină formează un epitop accesibil şi inductor al răspunsului imun. B. Acelaşi tripeptid, mascat de poli-L-alanină, legat de poli-L-lizină nu este imunogen (= = = poli-L-lizină; /// = poli – D, L – alanină; = L – tirozină; o = L – acid glutamic, după M. Sela, 1969).

Fig. 3. Epitopi secvenţiali şi conformaşionali (continui şi discontinui) ai antigenelor proteice (după Male, 1987).



imun faţă de două peptide sintetice, având epitopi cu aceiaşi compoziţie chimică, dar cu conformaţii spaţiale diferite. În primul caz, determinantul antigenic este tripeptidul tir-ala-glu inclus într-un polimer sintetic ramificat, multicatenar. Se obţin anticorpi anti-tripeptid. Dacă tripeptidul este polimerizat se obţine o moleculă cu structură periodică tir-ala-glu care dobândeşte formă α-helicală. După injectarea la iepure se obţin anticorpi care precipită molecula cu structură spaţială α-helix, dar nu precipită tripeptidul simplu. Pe baza acestor observaţii, M. Sela recunoaşte existenţa a două tipuri de determinanţi antigenici:

a) determinanţi antigenici *secvenţiali* a căror specificitate este dată de secvenţa subunităţilor componente (aminoacizi, monozaharide), indiferent de structura lor spaţială. Aceşti epitopi sunt comuni pentru toate polipeptidele care au o secvenţă identică şi sunt o sursă a reacţiilor încrucişate;

b) determinanţi antigenici *conformaţionali*, a căror specificitate derivă din configuraţia sterică a macromoleculei. Epitopii conformaţionali sunt de două tipuri; *continui* şi *discontinui*. Cei discontinui sunt formaţi din regiuni distincte ale moleculei, care se apropie când molecula se pliază în conformaţia sa nativă. Menţinerea integrităţii lor este condiţionată de legăturile S-S. După fragmentarea moleculei, epitopii conformaţionali discontinui îşi pierd totdeauna integritatea. Epitopii continui au o soartă variabilă: pot să-şi păstreze sau să piardă configuraţia avută în molecula nativă.

Importanţa epitopilor conformaţionali a fost evidenţiată pentru molecula de lizozim din albuşul de ou de găină. Bucla formată de aminoacizii 64–80 este închisă de o legătură S-S între două resturi de cisteină. Secvenţa buclei a fost sintetizată şi legată de polimerul ala-lys. Complexul format, după injectarea

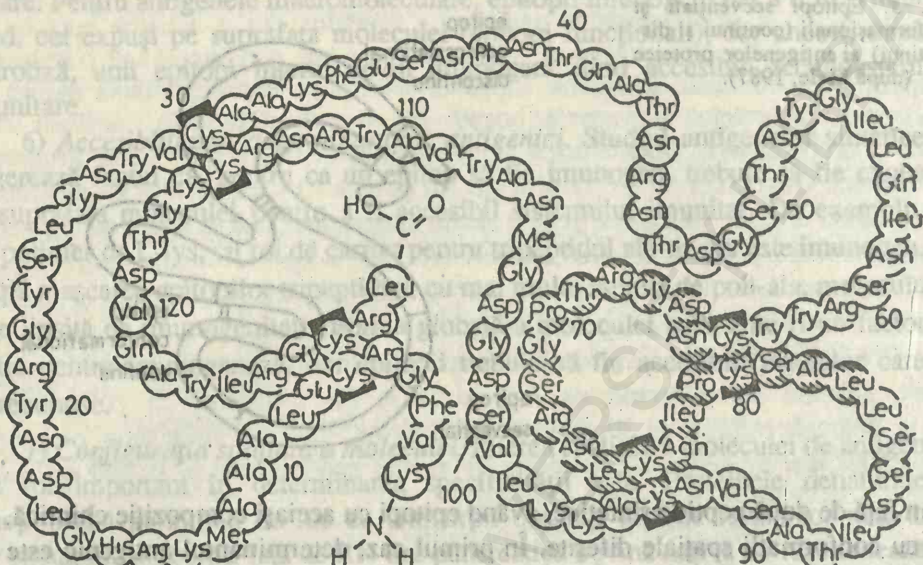


Fig. 4. Secvenţa aminoacizilor în molecula de lizozim din albuşul de ou găină, cu evidenţierea buclei peptidice (secvenţa 64–80), care are rol de epitop.

la iepure induce formarea anticorpilor care reacţionează exclusiv cu această secvenţă, care în proteina nativă are rol de epitop.

În general, anticorpii formaţi faţă de proteinele native sunt specifici, în primul rând faţă de epitopii conformaţionali şi mai rar faţă de cei secvenţiali.

8) *Rata metabolizării şi cantitatea de antigen administrată.* Rata metabolizării controlează raportul între cantitatea de antigen intact şi cel parţial degradat, care se găseşte la un moment oarecare după administrare, capabil să stimuleze producerea de anticorpi.

O cantitate prea mare de antigen produce „inundarea" organismului cu substanţe nonself şi răspunsul este paradoxal (paralizie imunologică). Este o reacţie de apărare a organismului, care îşi blochează toate modalităţile de răspuns imun. Paralizia poate surveni atât după injectarea unei cantităţi prea mari de antigen, cât şi după injectarea unei cantităţi moderate a unui antigen care se metabolizează greu. În organism ar exista, pentru fiecare antigen, un echilibru între paralizie şi stimulare, controlat genetic. Antigenele „bune" sunt rapid degradate

menajat şi stimulează răspunsul imun, iar antigenele „rele" induc paralizia imunologică deoarece sunt rezistente la degradare.

Cantitatea optimă necesară obţinerii unui răspuns imun optim este diferită de la un antigen la altul şi se determină experimental pentru fiecare caz în parte.

9) *Modul de administrare a antigenului influenţează imunogenitatea sa.* Administrarea multor substanţe nonself în asociaţie cu adjuvanţii le măreşte gradul de imunogenitate, iar pentru altele, asocierea cu un adjuvant este o condiţie obligatorie a imunogenităţii. Acest fapt este foarte important pentru proteinele uşor degradabile enzimatic, care, administrate ca atare dispar repede din organism, dar în asociaţie cu un adjuvant sunt eliberate treptat, stimulând organismul o perioadă mai îndelungată de timp. Administrarea intravenoasă anulează efectele adjuvanţilor.

Mai presus de condiţiile de imunogenitate ale antigenelor naturale sau sintetice, esenţială rămâne existenţa unui *control genetic* din partea organismului, asupra potenţialului antigenic al unei substanţe nonself. O moleculă oarecare poate fi un bun antigen pentru unele specii, dar neantigenică pentru altele. De exemplu, hemoglobina umană este slab antigenică pentru iepure, dar induce un răspuns imun intens la cobai şi la puiul de găină. Albumina serică bovină este imunogenă pentru iepure, dar slab imunogenă pentru om. Unele proteine străine nu sunt antigenice datorită unei omologii accentuate a secvenţei lor de aminoacizi, cu proteinele omologe ale gazdei. Uneori se înregistrează diferenţe mari de imunogenitate ale unei molecule nonself, la organisme ale aceleiaşi specii.

Concluzii asupra condiţiilor de antigenitate. Rezultatele experimentale referitoare la antigenitatea macromoleculelor naturale au evidenţiat faptul că polizaharidele sunt slab antigenice, deoarece nu au complexitatea moleculară necesară. ADN, ARN şi lipidele sunt neimunogene în stare nativă, dar după cuplarea lor cu un suport proteic îndeplinesc rolul de haptene şi sunt foarte imunogene. Din această cauză, nucleoproteinele şi lipoproteinele sunt antigene foarte eficiente.

Proteinele naturale sunt imunogene, dar pentru exprimarea la un nivel superior a acestei calităţi trebuie să îndeplinească condiţiile enumerate mai sus. Acestea, luate în parte sunt necesare dar nu suficiente. O bună antigenitate este rezultatul cumulării unui număr cât mai mare de condiţii.

Studiul antigenelor sintetice a facilitat alegerea unor antigene ideale. Ele trebuie să fie greu degradabile, să fie timoindependente şi să aibă un număr suficient de semnale imunogene (epitopi) conectate într-un ansamblu, denumit *imunon*.

ADJUVANŢII

Substanţele care în amestec sau în combinaţie cu un antigen, sau injectate simultan cu acesta intensifică răspunsul imun specific faţă de antigenul respectiv sunt denumite *adjuvanţi* (*adjuvere* = a ajuta).

Punctul de plecare al introducerii adjuvanţilor în practica imunologică a fost un fapt de observaţie: după asocierea unui vaccin bacterian celular cu un vaccin macromolecular (anatoxină), răspunsul imun antitoxină este mult mai intens decât atunci când cele două vaccinuri se administrează separat. După asocierea vaccinului antitifoparatific *A* şi *B* cu anatoxina tetanică (TAB), titrul anticorpilor faţă de anatoxina tetanică este de 20–30 ori mai mare decât în cazul injectării separate a anatoxinei tetanice. Explicaţia acestui fenomen a fost dată mai târziu: corpii celulari bacterieni determină un proces inflamator la

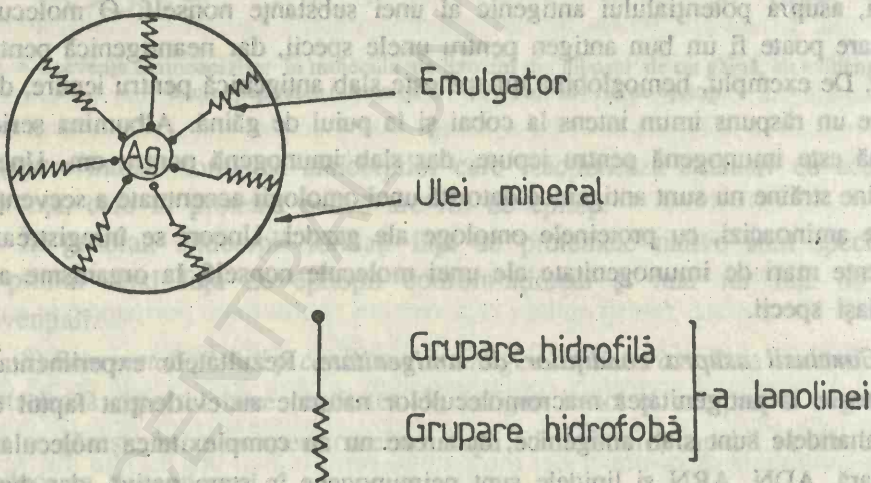


Fig. 5. Reprezentare schematică a interacţiunii moleculelor componente ale adjuvantului Freund.

locul introducerii vaccinului, care induce un aflux local de celule efectoare ale răspunsului imun (limfocite, macrofage). Acestea captează şi fixează anatoxina într-un stoc, de unde este eliberată treptat şi prelungesc durata de stimulare a sistemului imunitar.

Cel mai cunoscut şi folosit este adjuvantul *Freund*, o emulsie de apă în ulei mineral de parafină. Antigenul se suspendă în apă. Emulsia de apă în ulei

se realizează cu un emulgator care conține grupări lipofile și hidrofile (lanolina, arlacel A). Acesta este adjuvantul *Freund incomplet*. Prin adăugarea celulelor omorâte de *M. tuberculosis* rezultă adjuvantul *Freund complet*. Principiul activ al celulelor de *M. tuberculosis* este reprezentat de *ceruri* (glicolipide și glicolipopeptide). Glicolipopeptidele sunt formate din *acizi micolici* esterificați cu un polizaharid (care conține D și L-alanină, acid D-glutamic, acid diaminopimelic).

Modul de acțiune al adjuvanților. Adjuvanții determină următoarele efecte: 1) *persistența* antigenului în organism (întârzierea degradării sale) și eliberarea treptată în circulație; 2) picăturile de emulsie *vehiculează* antigenul pe cale limfatică, în tot organismul și spre ganglionii limfatici unde se va declanșa răspunsul imun; 3) adjuvantul Freund complet și incomplet măresc semnificativ titrul de anticorpi față de un antigen și fac imunogene doze mici care altfel nu ar fi imunogene.

Amestecul de adjuvant și antigen se administrează *subcutanat* sau *intradermic*. Administrarea intravenoasă anulează efectul adjuvantului. Este posibilă administrarea decalată la interval de câteva zile (mai întâi a adjuvantului), dacă cele două injectări se fac în același loc.

Efectul adjuvantului Freund este foarte spectaculos pentru dozele mici de antigen. Este foarte eficient în asociație cu antigenele proteice, bacteriene și virale. Stimulează răspunsul imun față de antigenele timodependente și favorizează producerea IgG.

Endotoxinele bacteriene au efect adjuvant. Ele sunt în același timp adjuvanți, antigene, toxine și factori pirogeni. Sunt lipopolizaharide produse de bacteriile Gram negative (*Salmonella, Brucella, Bordetella* etc.). Efectul maxim se obține numai dacă endotoxina este administrată în același timp sau la mai puțin de 6 ore după injectarea antigenului.

Capitolul II

IMUNOGLOBULINELE

Existenţa annticorpilor a fost demonstrată de Behring şi Kitasato (1890) în serul animalelor imunizate experimental cu toxina tetanică. Serul lor neutralizează toxina *in vitro* şi o face inofensivă pentru animalele de experienţă. Autorii au folosit denumirea de „anticorp" pentru a desemna substanţele protectoare ce apar în ser, faţă de un antigen corpuscular (bacterii).

Heidelberger (1930) a purificat anticorpii din ser şi a evidenţiat că aparţin fracţiei proteice.

Tiselius şi Kabat (1938) au demonstrat experimental că, de cele mai multe ori, funcţia de anticorp este asociată cu fracţia *gama* a proteinelor serice şi le-au dat denumirea de *γ-globuline.*

În 1970, OMS a stabilit prin consens între specialişti, ca substanţele cu proprietăţi de anticorp să fie grupate în categoria *imunoglobulinelor*, pornind de la faptul că toate substanţele din acest grup au funcţie imunitară şi sunt cuprinse în fracţia globulinică a serului. Anticorpii nu sunt numai gama-globuline. Există şi alte globuline cu funcţie de anticorp, după cun există şi gamaglobuline care nu au activitate de anticorp (proteinele Bence-Jones).

Anticorpii sunt imunoglobuline care se sintetizează în organism după pătrunderea unui antigen şi au proprietatea de a se cupla specific cu antigenul inductor şi de a-i anihila acţiunea nocivă. Termenul de *anticorp* în accepţiunea sa actuală a fost folosit de Ehrlich (1891) în lucrarea „Studii experimentale asupra imunităţii".

Anticorpii formează 20% din totalul proteinelor plasmatice, dar se găsesc şi în lichidele extravasculare, în secreţiile exocrine (salivă, lapte, lacrimi) şi ca molecule receptor pe suprafaţa limfocitelor B.

Moleculele de anticorpi au cea mai mică mobilitate electroforetică. Deşi sunt similare ca structură, moleculele de imunoglobuline formează o familie cu o diversitate imensă, neîntâlnită la nici o altă proteină. Diversitatea lor uriaşă este ordonată în clase şi subclase, în primul rând pe baza compoziţiei în

aminoacizi. Heterogenitatea compoziției în aminoacizi se reflectă în sarcina lor electrică, foarte diferită. În electroforeză, celelalte proteine serice migrează ca o bandă compactă, cu o mobilitate caracteristică, deoarece moleculele lor sunt omogene în ceea ce privește sarcina electrică, la un pH dat. Imunoglobulinele migrează ca o bandă largă, deoarece diferă prin sarcina electrică.

Molecule de anticorpi sunt extrem de heterogene din punctul de vedere al specificității lor față de epitopii antigenici inductori, deoarece antigenele corpusculare (virusuri, microorganisme) prezintă o foarte mare diversitate de epitopi. La rândul lor, antigenele moleculare, oricât de simple, sunt un *mozaic de epitopi*. Din această cauză moleculele de anticorpi au specificități de combinare foarte diferite, corespunzătoare epitopilor față de care s-au format. Diversitatea uriașă a specificității de combinare a anticorpilor generează o heterogenitate biochimică corespunzătoare, ceea ce a constituit un obstacol major în calea studiului lor prin metode analitice, deși anticorpii se găsesc totdeauna în sânge, cu excepția cazurilor patologice de *agamaglobulinemie*. Se punea problema găsirii unei surse de molecule omogene de anticorpi, care să aibă aceiași specificitate, nu față de un antigen dat (care este un mozaic de epitopi), ci cu specificitate față de un singur epitop.

Sursa naturală de imunoglobuline omogene, identice din punct de vedere biochimic este *mielomul multiplu* (plasmocitomul) o afecțiune tumorală malignă inițiată în măduva osoasă. Tumora se induce experimental la șoarecii sensibili (liniile NZB și BALB/c) prin injectarea intraperitoneală a uleiului mineral. Tumora este transplantabilă în serie. Plasmocitomul produce molecule de imunoglobuline identice din punct de vedere biochimic, *monoclonale*, denumite *proteine de mielom*, pentru că toate celulele tumorii sunt descendente ale unei singure celule producătoare de anticorpi. Imunoglobulinele de mielom se mai numesc *proteine M* (*m*ielom) sau *paraproteine* și reprezintă până la 95% din imunoglobulinele serice. Astfel de tumori apar spontan cu o frecvență mică la om, câine, cal, șobolan, șoarece.

Proteinele M au aceiași secvență de aminoacizi ca și imunoglobulinele normale. Uneori leagă specific determinanți antigenici cunoscuți: 5% din proteinele mielomului unei linii inbred de șoarece leagă determinanți genetici ai suprafeței celulelor bacteriene enterice. Probabil tumorile de mielom își au originea în limfocite B care proliferează ca răspuns la antigene specifice ale bacteriilor enterice.

În cazurile de mielom, în plasmă se acumulează nu numai molecule întregi de imunoglobuline: se pot acumula lanțuri ușoare (proteinele Bence-Jones, lanțuri grele ale izotipurilor α, γ, μ (boala lanțurilor grele) sau molecule întregi de IgM (în cazul macroglobulinemiei Waldenström).

STRUCTURA MOLECULEI DE IMUNOGLOBULINĂ

Structura moleculei de imunoglobulină (Ig) s-a stabilit prin analiza proteinelor omogene secretate de plasmocitoame, cu metodologii complexe: biochimice, analitice, cristalografia prin difracţie cu raze X.

Unitatea structurală de bază a moleculei de imunoglobulină este *monomerul.* Acesta este o unitate tetrapeptidică formată prin asocierea a două lanţuri grele (H, *H*eavy = greu), fiecare având circa 450 aminoacizi şi o greutate moleculară cuprinsă între 50–76 kD (D = Dalton; kD = kilodalton) şi două lanţuri uşoare (L, *L*ight = uşor), fiecare având circa 216 aminoacizi şi o greutate moleculară de 25 kD. Cele 4 lanţuri polipeptidice sunt legate între ele prin punţi S–S. Ele se răsucesc în spirală – atât unul faţă de altul, dar şi fiecare separat – faţă de propria-i axă, rezultând o configuraţie tridimensională. Configuraţia tridimensională a monomerului este stabilizată prin 16–24 legături covalente S–S şi prin alte interacţiuni necovalente, dobândind o formă de T sau de Y.

În funcţie de secvenţa aminoacizilor, fiecare lanţ polipeptidic este alcătuit din două regiuni diferite:

– *regiunea variabilă* (V) situată la extremitatea N-terminală a fiecărui lanţ. Cele două regiuni variabile formează situsurile de combinare ale moleculei de imunoglobulină care conferă specificitatea de legare cu antigenul;

– *regiunea constantă* (C) corespunde jumătăţii C-terminale a celor 4 lanţuri polipeptidice. Are o secvenţă relativ uniformă a aminoacizilor şi asigură unitatea structurală şi funcţională a molecului de imunoglobulină.

Aproape de mijlocul lanţurilor H se găseşte o secvenţă de circa 15 aminoacizi, în care sunt grupate toate moleculele de cisteină, ce formează punţi S–S intercatenare. Se numeşte regiunea *balama.*

Cele 16–24 legături S–S ale monomerului tetrapeptidic sunt constante ca număr şi localizare pentru diferite clase de imunoglobuline. Sunt 3 categorii de punţi S–S;

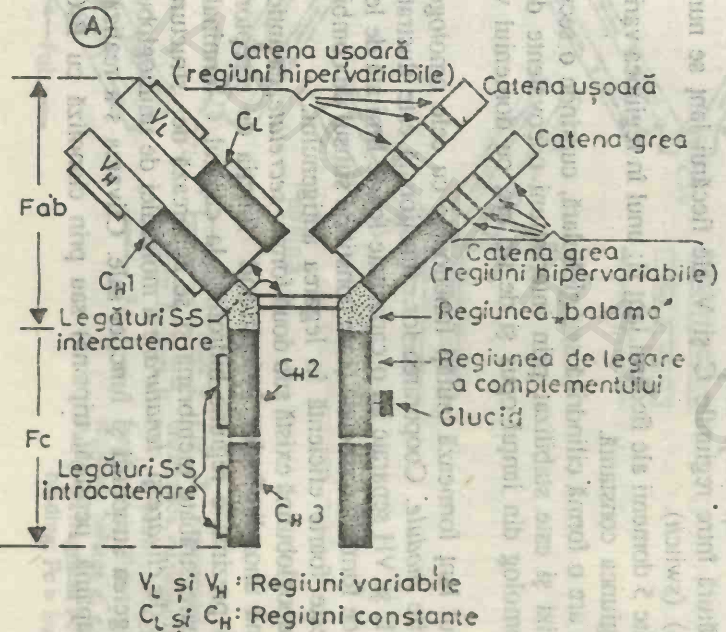
– legături *intercatenare* H–H sau L–H (legăturile L–L s-au descris la IgA2 şi la proteinele Bence-Jones, care sunt dimeri de lanţuri L);

– legături *intercatenare* între lanţurile H ce aparţin unor monomeri diferiţi (la IgA_2 şi IgM unde formează complexe moleculare polimerice);

– legături *intracatenare* care definesc structura terţiară a fiecărui lanţ

Regiunea variabilă a celor două tipuri de lanţuri (H şi L) cuprinde o secvenţă de circa 110 aminoacizi în jumătatea N-terminală a celor 4 lanţuri polipeptidice. Mărimea sa nu este fixă: intervin inserţii sau deleţii de 3–6 aminoacizi.

Variabilitatea lanţului L se concentrează în 3 segmente corespunzătoare aminoacizilor din poziţiile 24–34, 50–55, 89–97, iar a lanţului H se concentrează



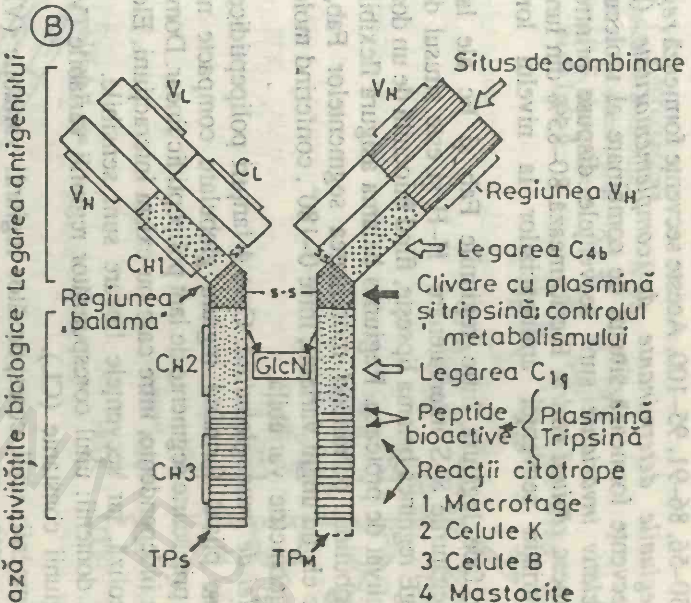


Fig. 6. Modele generale de structură a imunoglobulinelor, bazate pe IgG_1 umană. A. Structura pe domenii a catenelor L și H, poziția regiunilor variabile și hepervariabile și a regiunii „balama". B. Localizarea diferitelor funcții ale moleculei de anticorp (după Putnam și colab., 1985).

în 4 segmente: 30–36, 50–56, 86–91, 95–100. Aceste secvenţe formează *regiunile hipervariabile* sau *regiunile determinante de complementaritate* (RDC). Aminoacizii acestor secvenţe formează situsul de combinare al moleculei de anticorp. Regiunile *relativ invariante* sunt secvenţele dispuse printre cele hipervariabile şi se numesc *regiuni cadru*. Ele formează 80–85% din lungimea regiunii variabile. Variaţia secvenţei aminoacizilor la nivelul lor este limitată (5%).

Regiunea balama face legătura între regiunile Fab şi Fc ale lanţului H. Ea cuprinde toate legăturile S–S intercatenare H–H şi este situsul de atac al papainei. La IgM şi IgE regiunea balama lipseşte, fiind înlocuită de un domeniu suplimentar, care este clivat de proteaze. Regiunea balama asigură flexibilitatea moleculei de imunoglobulină, permiţând mobilitatea segmentelor Fab, care teoretic pot forma între ele un unghi variabil, între 0–180°, conferind moleculei de imunoglobulină o geometrie variabilă.

Domeniile moleculei de imunoglobulină. Cele 4 lanţuri polipeptidice sunt răsucite în spirală şi se pliază formând regiuni globulare compacte numite *domenii*, legate între ele prin scurte segmente de lanţ polipeptidic linear. Domeniile sunt regiuni moleculare independente, între care nu exista interacţiuni. Ele sunt mai rezistente la proteoliză, iar secvenţele lineare sunt sensibile.

Lanţul L are două domenii: unul corespunzător regiunii variabile (VL) şi altul corespunzător regiunii constante (CL).

Lanţul H are 4 domenii: unul corespunzător regiunii variabile (VH) şi 3 ale regiunii constante: CH_1, CH_2, CH_3.

Secvenţa de legătură între regiunile C şi V ale fiecărui lanţ se numeşte *zonă de comutare* (s) (swit*ch*).

IgM şi IgE au câte 5 domenii ale fiecărui lanţ H: unul în regiunea variabilă şi 4(CH_1–CH_4) în regiunea constantă.

Fiecare domeniu are o formă cilindrică sau globulară, cuprinde o secvenţă de circa 60 aminoacizi şi este stabilizat prin interacţiuni necovalente de tip *trans*, cu domeniul omolog din lanţul opus şi de tip *cis*, cu domeniul vecin de pe acelaşi lanţ.

Domeniile fiecărui lanţ formează unităţi funcţionale cu cele omologe ale lanţului opus, denumite *module*. Cooperarea lor funcţională este ilustrată de faptul că domeniile VL şi VH separate au o capacitate foarte limitată de legare a antigenului, în timp ce forma lor asociată (care constituie situsul de combinare al imunoglobulinei) este foarte eficientă în legarea antigenului.

Moleculele de imunoglobulină există sub două forme: *secretate*, ca anticorpi şi *legate* de membrana unor limfocite, îndeplinând funcţia de receptori de antigen. Forma legată prezintă o regiune hidrofobă la capătul C-terminal, de circa 30 aminoacizi, care străbate membrana şi se ancorează de structura ei.

Metodele chimice de *clivare* şi *denaturare* a moleculei de imunoglobulină au contribuit la înţelegerea structurii şi funcţiei sale. Clivarea s-a realizat cu metode enzimatice (papaină, pepsină, tripsină) sau prin cianoliză cu BrCN.

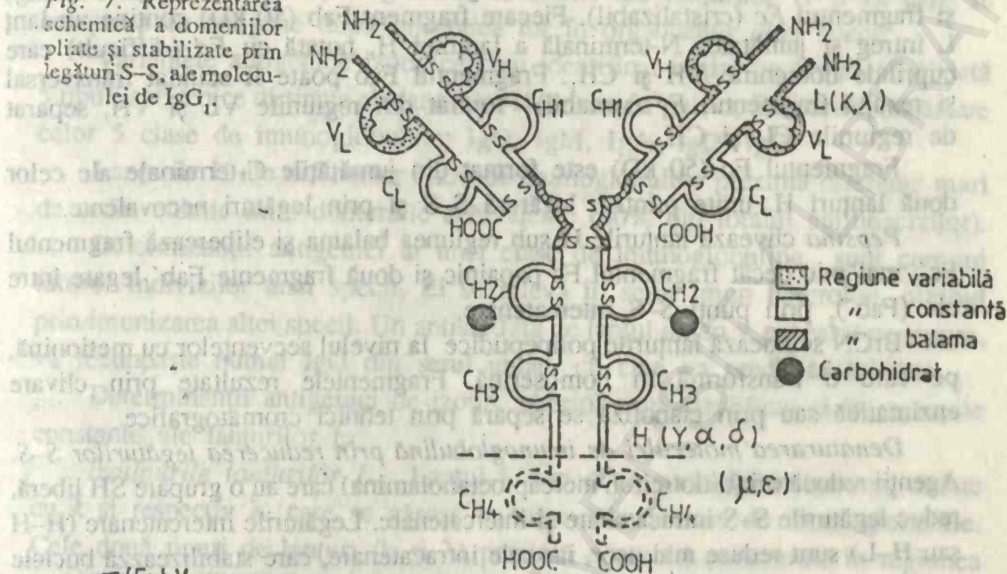


Fig. 7. Reprezentarea schemică a domeniilor pliate şi stabilizate prin legături *S–S*, ale moleculei de IgG_1.

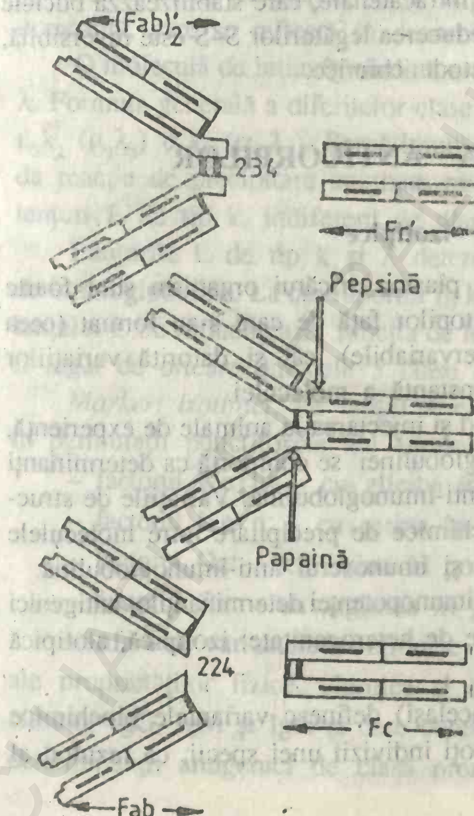


Fig. 8. Fragmentele rezultate din clivarea enzimatică, cu papaină şi tripsină a moleculei de IgG_1. Pepsina clivează catenele H şi eliberează fragmentele $(Fab')_2$ şi Fc´. Papaina clivează în regiunea balama şi eliberează două fragmente Fab şi un fragment Fc (Fab = fragment antigen binding; Fc = fragment cristalizibil).

Papaina scindează molecula de imunoglobulină la nivelul regiunii balama (aminoacidul 224) şi eliberează două fragmente *Fab* (*F*ragment *a*ntigen *b*inding) şi fragmentul *Fc* (*c*ristalizabil). Fiecare fragment Fab (50 kD) conţine un lanţ L întreg şi jumătatea N-terminală a lanţului H, notată cu *Fd* (*d*ifficult) care cuprinde domeniile VH şi CH_1. Fragmentul Fab poate fi scindat transversal şi rezultă fragmentul *Fv* (*v*ariabil) format din regiunile VL şi VH, separat de regiunile CL şi CH_1.

Fragmentul Fc (50 kD) este format din jumătăţile C-terminale ale celor două lanţuri H, unite printr-o legătură S–S şi prin legături necovalente.

Pepsina clivează lanţurile H sub regiunea balama şi eliberează fragmentul Fc´, mai mic decât fragmentul Fc papainic şi două fragmente Fab´ legate între ele $(Fab')_2$ prin punţi S–S intercatenare.

BrCN scindează lanţurile polipeptidice la nivelul secvenţelor cu metionină, pe care o transformă în homoserină. Fragmentele rezultate prin clivare enzimatică sau prin cianoliză se separă prin tehnici cromatografice.

Denaturarea moleculei de imunoglobulină prin reducerea legăturilor S–S. Agenţii reducători (ditiotreitol, mercaptoetanolamina) care au o grupare SH liberă, reduc legăturile S–S intracatenare şi intercatenare. Legăturile intercatenare (H–H sau H–L) sunt reduse mai uşor, iar cele intracatenare, care stabilizează buclele polipeptidice sunt disociate mai greu. Reducerea legăturilor S–S este reversibilă, dar se poate stabiliza prin diferite metode chimice.

HETEROGENITATEA ANTICORPILOR

Variantele izotipice

Moleculele de imunoglobulină din plasma oricărui organism sunt foarte heterogene, atât datorită diversităţii epitopilor faţă de care s-au format (ceea ce induce variaţii ale secvenţelor hipervariabile), cât şi datorită variaţiilor secvenţei aminoacizilor în regiunea constantă a moleculei.

După asocierea cu adjuvantul Freund şi injectarea la animale de experienţă, variaţiile de structură chimică ale imunoglobulinei se comportă ca determinanţi antigenici şi induc sinteza anticorpilor anti-imunoglobulină. Variaţiile de structură se evidenţiază prin metode imunochimice de precipitare între moleculele de imunoglobulină (cu rol de antigen) şi imunoserul anti-imunoglobulină.

Din punctul de vedere al manifestării imunopotenţei determinanţilor antigenici ai imunoglobulinei, s-au definit 3 nivele de heterogenitate: izotipică, alotipică şi idiotipică.

Heterogenitatea izotipică (izos = acelaşi) definesc variantele biochimice ale imunoglobulinelor, comune pentru toţi indivizii unei specii, ca rezultat al

variaţiilor de structură a regiunilor *constante* ale lanţurilor H şi L, care se comportă ca antigene după injectarea lor în organismul *altei specii.*

Variantele antigenice izotipice s-au identificat iniţial pe lanţul H. Există 5 tipuri antigenice distincte ale lanţurilor H, notate cu γ, μ, α, δ, ε, corespunzătoare celor 5 clase de imunoglobuline: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE.

Lanţurile H ale diferitelor clase de imunoglobuline prezintă diferenţe mari de ordin chimic între domeniile echivalente (60% din totalul aminoacizilor).

Determinanţii antigenici ai unei clase de imunoglobuline sunt comuni tuturor indivizilor unei specii. Ei se relevă în serul imun heterolog, obţinut prin imunizarea altei specii. Un antiser faţă de lanţul uman γ, preparat pe iepure, va recunoaşte numai IgG din serul uman, cu care va precipita *in vitro.*

Determinanţii antigenici de izotip, ulterior s-au identificat şi în regiunile constante ale lanţurilor L.

Izotipurile lanţurilor L. Lanţul L are două variante antigenice, notate cu *k* şi respectiv λ, care se găsesc la toate cele 5 clase de imunoglobuline. Cele două tipuri de lanţuri (k şi λ) prezintă deosebiri structurale în regiunea constantă, care se reflectă în deosebiri antigenice.

O moleculă de imunoglobulină are două lanţuri L de tip k, ori două lanţuri λ. Formula generală a diferitelor clase de imunoglobuline va fi: $\gamma_2 k_2$ (sau $\gamma_2\lambda_2$), $\mu_2 k_2$ ($\mu_2\lambda_2$) $\alpha_2 k_2$ ($\alpha_2\lambda_2$). Serul imun anti-lanţ k uman, preparat pe iepure va da reacţie de precipitare cu toate moleculele de imunoglobulină care conţin lanţuri L de tip k, indiferent de clasă.

Lanţurile L de tip k şi λ determină *tipurile şi subtipurile* moleculelor de imunoglobuline. La om raportul Ig k/λ este 7/3, iar la şoarece 19/1. Izotipurile lanţului L nu influenţează funcţia de legare a antigenului: acelaşi antigen poate fi legat de oricare din cele 5 clase de imunoglobuline.

Markeri izotipici. Pe lanţul λ există doi markeri antigenici cu originea în permutaţii punctiforme ale aminoacizilor;

– factorul Kern$^+$ – cu glicina în poziţia 154;
– factorul Kern$^-$ – cu serina în poziţia 154;
– factorul Oz$^+$ – cu lizina în poziţia 190;
– factorul Oz$^-$ – cu arginina în poziţia 190.

În afară de variantele menţionate – clase şi tipuri s-au evidenţiat diferenţe ale proprietăţilor fizice, chimice şi biologice ale moleculelor în interiorul claselor IgG, IgM şi IgA şi care corespund *subclaselor* antigenice. Pe lângă determinanţii antigenici de clasă prezenţi pe fiecare lanţ H, există şi alte

variante antigenice ale imunoglobulinelor, corespunzătoare subclaselor. Ele se găsesc în serul normal şi se notează cu litera clasei, urmată de un număr: IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, IgA_2.

Imunoglobulinele dintr-o subclasă au în comun determinanţi antigenici specifici clasei, cărora li se adaugă determinanţi antigenici proprii fiecărei subclase, aducând un nivel superior de heterogenitate a lanţurilor H.

Diferenţele în secvenţa aminoacizilor între diferitele subclase sunt mici: 24 aminoacizi între IgG_1 şi IgG_4. Moleculele diferitelor subclase sunt produse de celule diferite.

Variantele alotipice

Descoperirea alotipiei (alos = altul) a pornit de la următorul fapt de observaţie: în serul pacienţilor cu artrită cronică reumatoidă se găsesc molecule de tip special denumite *factor reumatoid* (FR). FR este IgM anti IgG (auto-anticorp).

FR se evidenţiază prin capacitatea sa de a determina aglutinarea eritrocitelor învelite cu anticorpi antieritrocitari (IgG), într-o doză subaglutinantă.

Grubb (1956) a observat că FR seric aglutinează hematiile învelite cu anticorpi incompleţi (care apar în anemia hemolitică autoimună), ale unor pacienţi, iar alteori reacţia de hemaglutinare nu se produce, testul evidenţierii FR fiind fals negativ.

Concluzia a fost că anticorpii incompleţi de pe suprafaţa eritrocitelor unor indivizi posedă determinanţi antigenici pe care FR nu-i recunoaşte. S-a dedus astfel că imunoglobulinele de la diferiţii indivizi sunt diferite din punct de vedere antigenic. În consecinţă, imunizarea unui organism cu imunoglobuline provenite de la un organism al aceleiaşi specii determină apariţia anticorpilor faţă de determinanţii antigenici ai moleculelor de imunoglobulină ale donorului.

Imunoglobulinele sunt aloantigene ineficiente dacă sunt injectate ca proteine solubile, la om şi la iepure. De aceea transfuziile de sânge total, plasmă sau injectarea imunoglobulinelor solubile nu induc formarea anticorpilor antiimunoglobuline ale donorului. Moleculele de imunoglobuline devin antigenice după asocierea lor cu adjuvantul Freund.

Semnificaţia variantelor antigenice alotipice ale moleculei de imunoglobulină este analogă celei a antigenelor de grup sanguin. Fenomenul este general, adică orice moleculă provenită de la un organism poate fi imunogenă pentru alte organisme ale aceleiaşi specii, la care se comportă ca aloantigen.

Variantele alotipice ale imunoglobulinelor se detectează în reacţia de precipitare cu aloantiseruri, preparate pe organisme cu alotip diferit de acela al organismului donor al antigenului imunoglobulinic.

Variantele alotipice sunt rezultatul existenţei genelor alele (perechi), o caracteristică generală a organismelor diploide. Când mutaţia se produce de mai multe ori în acelaşi locus, apar mai multe alele (o serie polialelică) a_1, a_2, a_3 ....a_n. Genele alele ocupă acelaşi locus pe cromosomii omologi, pe care l-a avut gena normală A. Fiecare individ va avea o anumită combinaţie de gene alele: Aa_1, Aa_2, ... Aa_n, cu variante antigenice distincte.

Alotipurile imunoglobulinelor sunt rezultatul variaţiilor secvenţei aminoacizilor în *regiunile constante* ale lanţurilor H şi L, ceea ce le conferă un grad superior de heterogenitate.

La om s-au descris 3 categorii de markeri alotipici:

– factorii Gm (*g*ama *m*arker), numerotaţi 1–25, pe lanţul H al subclaselor de IgG;

– factorii $A_2m(1)$ şi $A_2m(2)$ pe lanţurile $H\alpha_2$ ale subclasei IgA_2;

– factorii Km(Inv) pe lanţurile Lk.

Foarte rar, determinanţii antigenici alotipici sunt localizaţi în regiunile variabile ale moleculei.

Variantele idiotipice ale imunoglobulinelor

Idiotipul (idios = individ) este reprezentat de o populaţie omogenă de molecule de anticorpi, produse de descendenţii unei clone celulare, care recunosc un singur determinant antigenic (epitop).

Specificitatea idiotipică a unei populaţii de anticorpi s-a dedus astfel:

– Antigenul (*S. typhi*) s-a injectat la organismele A şi B (iepuri). S-au sintetizat anticorpi aglutinanţi 1 şi 2, anti *S. typhi*.

– Anticorpii aglutinanţi 1 (produşi de organismul A) s-au injectat în organismul C (iepure). Se sintetizează anticorpi anti–anticorpi 1, evidenţiaţi într-o reacţie de precipitare, dar care nu precipită anticorpii 2, deşi anticorpii 1 şi 2 au aceiaşi specificitate (sunt anti *S. typhi*), iar organismele A, B şi C aparţin aceluiaşi alotip.

Concluzia: Anticorpii 1 şi 2 deşi au aceiaşi specificitate faţă de antigen, la rândul lor au determinanţi antigenici proprii şi de aceea anticorpii anti–anticorpi 1 nu recunosc anticorpii 2, produşi de alt organism. Moleculele de anticorpi, cu aceiaşi specificitate faţă de un antigen, produse de organisme diferite au individualitate antigenică distinctă, denumită specificitate *idiotipică*.

Determinanţii idiotipici sunt localizaţi în regiunile hipervariabile ale lanţurilor H şi L. Specificitatea idiotipică a moleculelor de anticorpi sintetizaţi de o clonă de celule, este conferită de particularitatea structurală a *situsurilor lor de combinare*. Aici se găsesc epitopii cu caracter individual numiţi *idiotopi*.

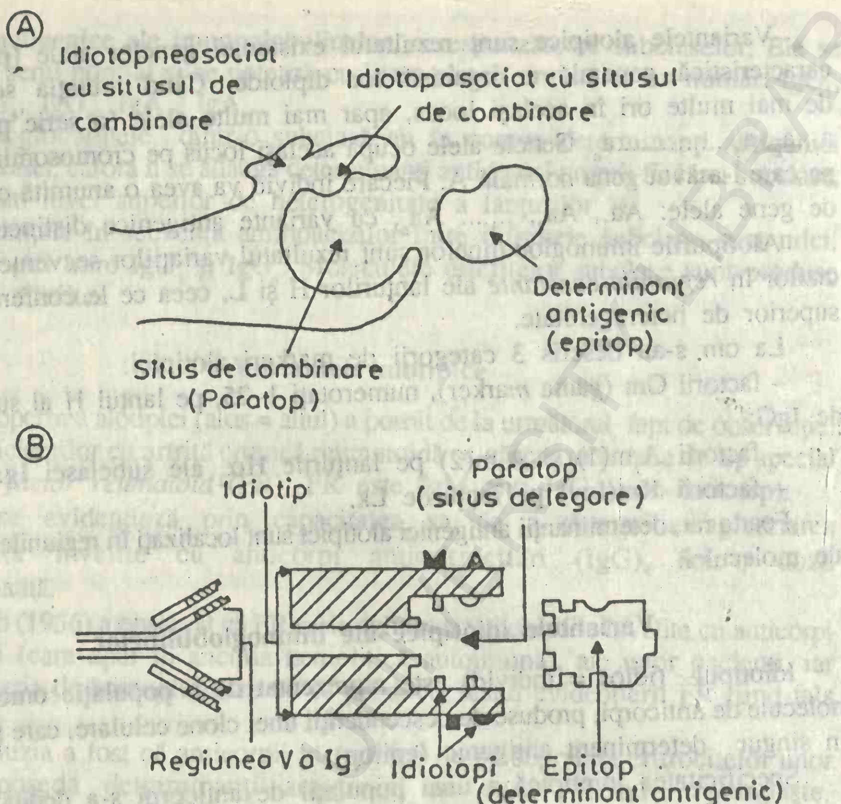


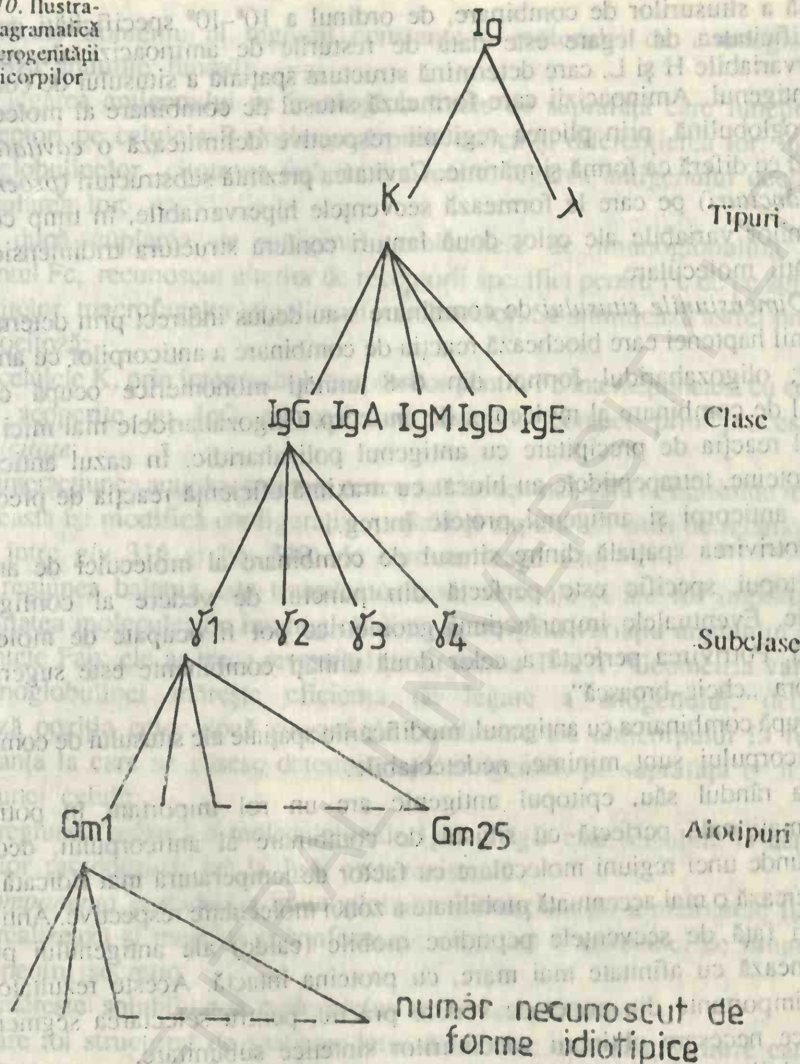
Fig. 9. Reprezentarea schematică a structurii regiunii variabile a imunoglobulinei, evidenţiind localizarea idiotopilor şi a paratopilor (A) (după Paul, 1984) şi relaţia lor cu epitopul (B) (după Roitt şi colab., 1985).

Colecţia de *idiotopi* a situsului de combinare al unei molecule de imunoglobulină formează *idiotipul* ei. Unii idiotopi sunt localizaţi foarte aproape de situsul de combinare sau chiar în interiorul său. Dovada o constituie faptul că legarea antigenului de situsul de combinare blochează într-o măsură mai mare sau mai mică legarea anticorpilor antiidiotipici.

Idiotipul este rezultatul configuraţiei spaţiale unice a regiunilor hipervariabile a lanţurilor H şi L, conferită de o secvenţă unică a aminoacizilor. Repertoriul idiotipurilor este de acelaşi ordin de mărime cu acela al situsurilor de combinare. Pentru situsul de combinare al moleculei de imunoglobulină s-a propus denumirea de *paratop*.

La constituirea idiotipului participă ambele lanţuri (H şi L). Cele două lanţuri disociate nu pot să lege antiidiotipul, sau îl leagă cu o eficienţă foarte scăzută.

Fig. 10. Ilustrarea diagramatică a heterogenității anticorpilor



FUNCȚIILE MOLECULEI DE IMUNIGLOBULINĂ

În ansamblul sistemului imunitar, moleculele de imunoglobulină îndeplinesc două categorii de funcții: de *specificitate* și *activități biologice efectoare*.

1) *Specificitatea* față de un antigen este exprimată prin capacitatea de recunoaștere fină a epitopului complementar al antigenului și de combinare cu acesta. Specificitatea moleculei de imunoglobulină este conferită de situsul său de combinare. Marea diversitate a moleculelor de anticorpi asigură o diversitate

uriaşă a situsurilor de combinare, de ordinul a 10^8–10^9 specificităţi de legare. Specificitatea de legare este dată de resturile de aminoacizi ale regiunilor hipervariabile H şi L, care determină structura spaţială a situsului de combinare cu antigenul. Aminoacizii care formează situsul de combinare al moleculei de imunoglobulină, prin plierea regiunii respective delimitează o *cavitate moleculară* ce diferă ca formă şi mărime. Cavitatea prezintă substructuri (*proeminenţe şi adâncituri*) pe care le formează secvenţele hipervariabile, în timp ce restul regiunilor variabile ale celor două lanţuri conferă structura tridimensională a cavităţii moleculare.

Dimensiunile situsului de combinare s-au dedus indirect prin determinarea mărimii haptenei care blochează reacţia de combinare a anticorpilor cu antigenul întreg: oligozaharidul format din 6–8 unităţi monomerice ocupă complet situsul de combinare al moleculei de anticorp. Oligozaharidele mai mici inhibă parţial reacţia de precipitare cu antigenul polizaharidic. În cazul anticorpilor antiproteine, tetrapeptidele au blocat cu maximă eficienţă reacţia de precipitare dintre anticorpi şi antigenul proteic întreg.

Potrivirea spaţială dintre situsul de combinare al moleculei de anticorp şi epitopul specific este perfectă din punctul de vedere al configuraţiei spaţiale. Eventualele imperfecţiuni geometrice pot fi ocupate de moleculele de apă. Potrivirea perfectă a celor două unităţi combinante este sugerată de metafora „cheie–broască".

După combinarea cu antigenul, modificările spaţiale ale situsului de combinare al anticorpului sunt minime, nedetectabile.

La rândul său, epitopul antigenic are un rol important în potrivirea conformaţională perfectă cu situsul de combinare al anticorpului, deoarece corespunde unei regiuni moleculare cu factor de temperatură mai ridicată, ceea ce sugerează o mai accentuată mobilitate a zonei moleculare respective. Anticorpii obţinuţi faţă de secvenţele peptidice mobile (calde) ale antigenului proteic reacţionează cu afinitate mai mare, cu proteina intactă. Aceste rezultate sunt foarte importante din punct de vedere practic, pentru selectarea segmentelor peptidice necesare obţinerii vaccinurilor sintetice subunitare.

Mobilitatea unui determinant antigenic îi permite să se adapteze mai uşor într-un situs de legare preexistent al moleculei de anticorp, chiar în situaţiile în care epitopul antigenic nu se potriveşte exact geometriei unei molecule proteice. Flexibilitatea epitopului îi permite să se adapteze configuraţiei situsului de combinare al anticorpului. Din acest motiv, unirea antigenului cu anticorpul seamănă cu întâlnirea a doi nori şi nu cu aceea a două pietre.

2) *Funcţiile biologice efectoare* sunt amorsate de reacţia antigen–anticorp. Numărul lor este mai mic şi sunt dependente de regiunile constante ale moleculei de imunoglobulină.

Fiecare domeniu al regiunii constante a moleculei de imunoglobulină realizează anumite funcții:

– legarea antigenului pe imunoglobulinele de suprafață care funcționează ca receptori pe celulele B declanșază proliferarea și diferențierea lor; în cazul imunoglobulinelor citotrope față de mastocite, legarea antigenului declanșază degranularea lor;

– după cuplarea cu antigenul, moleculele de imunoglobulină expun segmentul Fc, recunoscut ulterior de receptorii specifici pentru Fc de pe suprafața monocitelor, macrofagelor și polimorfonuclearelor. Se stimulează astfel procesul de fagocitoză;

– celulele K, prin intermediul receptorilor pentru Fc interacționează cu celulele străine acoperite cu IgG și realizează liza de contact prin procesul de *citotoxicitate*;

– interacțiunea antigen–anticorp generează un semnal, care se transmite regiunii Fc. Aceasta își modifică configurația spațială și expune un situs de recunoaștere (situat între *gly* 316 și lys 340) de care se leagă Clq;

– regiunea balama este transductoare de semnale și are rol important în flexibilitatea moleculei de imunoglobulină, permițând variația unghiului dintre segmentele Fab: ele ar trece reversibil de la forma T la Y. Geometria variabilă a imunoglobulinei mărește eficiența de legare a antigenului, deoarece ajustează poziția celor două situsuri de combinare ale anticorpului în funcție de distanța la care se găsesc determinanții antigenici, pe suprafața unui virus sau a unei celule;

– regiunea balama a moleculelor de IgG și IgD este sensibilă la acțiunea enzimelor proteolitice, iar la IgA este rezistentă.

Componenta glucidică a imunoglobulinei îndeplinește următoarele funcții:

– realizează și menține o conformație esențială a moleculei de imunoglobulină pentru secreție;

– mărește solubilitatea moleculelor de imunoglobulină;

– are rol structural de spațiator între domeniile unui lanț și între catenele moleculei;

– participă la funcțiile citotrope ale moleculei de imunoglobulină;

– are rol în legarea Clq, componentă a sistemului complement.

IMUNOGLOBULINA G

IgG este cea mai heterogenă dintre imunoglobuline în ceea ce privește sarcina electrică. În câmpul electroforetic, IgG se distribuie în fracțiile γ1 și γ2 ale serului. IgG este majoritară în serul uman normal, reprezentând 70–75%

din cantitatea totală de imunoglobuline. Concentraţia sa medie în ser este de 1250 mg/100 ml, cu variaţii individuale între 800 şi 2000 mg/100 ml.

IgG este un monomer cu g m de 150 kD şi cu constanta de sedimentare 7 S. IgG_3 este mai grea, datorită lanţului γ3. Componenta glucidică reprezintă, în medie, 3% din greutatea moleculară a IgG.

IgG se sintetizează tardiv în răspunsul imun primar, dar este imunoglobulina predominantă a răspunsului imun secundar. Ea este repartizată uniform în compartimentele intra- şi extravasculare.

IgG se prezintă sub forma a 4 variante antigenice, conferite de compoziţia în aminoacizi a lanţului γ: IgG_1, IgG_2, IgG_3 şi IgG_4. Proporţia normală a celor 4 subclase este de 66% pentru IgG_1, 23% pentru IgG_2, 7% pentru IgG_3 şi 4% pentru IgG_4.

IgG este singura imunoglobulină care traversează placenta şi astfel asigură protecţia fătului şi a nou-născutului în primele luni de viaţă. Pe membrana celulelor sinciţio-trofoblastului se găsesc receptori pentru segmentul Fc al IgG, care mediază transferul placentar.

Funcţia esenţială a IgG este neutralizarea toxinelor bacteriene. IgG activează sistemul complement şi produce liza celulelor bacteriene şi a particulelor virale învelite. IgG inactivează virusurile. *In vivo* are şi rol opsonizant. *In vitro*, IgG participă la reacţiile de aglutinare şi precipitare.

Timpul de înjumătăţire al IgG este de 21 zile.

IMUNOGLOBULINA A

Unitatea de bază a structurii IgA este *monomerul*, alcătuit din două catene grele (H) cu specificitate de clasă (izotipică) *alfa* şi două catene uşoare (L) de tip λ sau *k*.

Unitatea monomerică $(H\lambda)_2$ sau $(Hk)_2$ are o tendinţă constantă de a produce structuri moleculare polimerice, formate din 2, 3, 4 sau 5 monomeri (10 S, 13 S, 15 S, respectiv 17-18 S), care, în ser se găsesc în concentraţii descrescânde.

La microscopul electronic, molecula de IgA monomeră are aspectul literei Y. Complexele dimerice au forma a două litere Y, aşezate una în prelungirea celeilalte. Cele două fragmente Fc formează un lanţ lung şi rigid.

IgA se găseşte atât în plasma sanguină, cât şi în secreţiile externe: salivă, lacrimi, secreţia vaginală, gastrică, intestinală, biliară, pancreatică, lactată.

Pe baza unor diferenţe de structură moleculară (numărul punţilor S-S, secvenţa aminoacizilor în regiunea balama), au fost descrise două subclase de IgA: IgA_1 şi IgA_2.

IgA serică este reprezentată în primul rând de IgA_1 (90%) şi este monomeră în proporţie de 80%. Catenele L şi H sunt reunite prin două punţi S-S.

Subclasa IgA_2 reprezintă numai 10% din IgA serică. Pe baza markerilor alotipici ai catenei H se subdivide în două variante alotipice: A_2m_1 (tip caucazian) şi A_2m_2 (tip mongoloid–negroid), datorită incidenţei sale la diferite rase umane.

Funcţiile IgA serice nu sunt bine precizate, datorită dificultăţilor de purificare. Nu fixează complementul. Rolul său cel mai important ar fi acela de a *îndepărta cantităţile mici de antigene* provenite din alimente, sau antigenele solubile ale microorganismelor, absorbite în circulaţia generală. Eliminarea lor timpurie împiedică accesul acestor antigene la celulele sistemului imunitar şi stopează declanşarea unui răspuns imun de amploare, care ar devia forţele de apărare ale organismului, de la funcţia sa esenţială, aceea a apărării antiinfecţioase.

IgA din secreţii se găseşte în produsele de secreţie ale mucoaselor, ca şi în secreţia biliară şi pancreatică. De aici derivă şi denumirea sa improprie, *IgA secretoare* (sIgA), deşi mai corectă ar fi *IgA din secreţii*. Se găseşte în special în formă dimerică (80%), iar restul ca monomer sau alt tip de polimer.

sIgA este produsă de structurile limfoide ale mucoaselor. În mucoasa nazală, a antrului piloric, a intestinului subţire, în lamina propria a epiteliului acinilor secretori ai glandelor salivare şi mamare, în glandele lacrimale se găsesc numeroase plasmocite şi precursorii lor. Imunizarea orală stimulează în primul rând producerea de IgA.

Molecula de sIgA dimeră este alcătuită din doi monomeri de IgA, la care se adaugă catena *J* (*j*oining) şi un lanţ suplimentar denumit *componenta* secretoare (CS). Formula generală a sIgA dimer este $(IgA)_2$ J CS. Întreaga moleculă are g.m. de 385 kD, iar constanta de sedimentare este 10 S.

Complexul molecular $(IgA)_2$ J CS este foarte rezistent la proteoliză, datorită conformaţiei speciale, dobândită după legarea catenei J şi a lanţului CS, precum şi datorită capacităţii sale de a se lega de mucinele din secreţii.

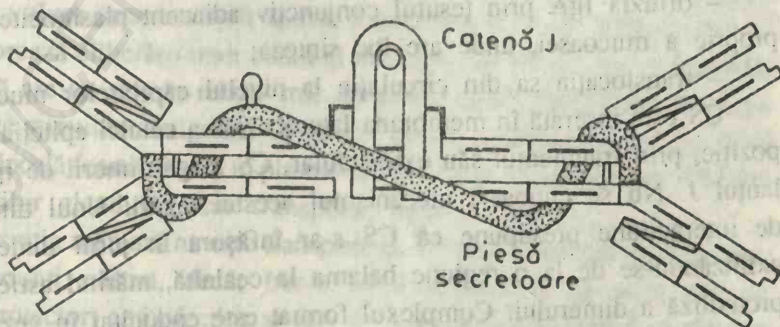


Fig. 11. Structura IgA_1 secretoare ($sIgA_1$) umană. Componenta secretoare este, probabil, înfăşurată în jurul dimerului de IgA şi legată prin punte S-S de domeniul Cα2 al fiecărui monomer. Catena J participă la legarea celor două subunităţi (după Roitt şi colab., 1985).

Catena J este un glicopeptid cu 129 aminoacizi (g m = 15 kD), bogat în acizi glutamic şi aspartic şi un oligozaharid care se leagă de asparagina din poziţia 43. Conţine 7–8 resturi de cisteină. Lanţul J se leagă prin punţi S–S de penultima cisteină a octapeptidului terminal al fiecărui lanţ H. În complexele moleculare cu un grad superior de polimerizare, numai două molecule de IgA sunt legate prin intermediul lanţului J, celelalte fiind legate direct una de alta. Polimerizarea moleculelor de IgA este esenţială pentru transportul lor la suprafaţa mucoasei.

Componenta secretoare a sIgA este o glicoproteină din categoria betaglobulinelor, neînrudită cu imunoglobulinele, bogată în glucide (8,7%). Conţine circa 750 aminoacizi, distribuiţi în 3 domenii: citoplasmatic (103 aminoacizi), transmembranar (23 aminoacizi) şi extracelular (circa 625 aminoacizi), la care se adaugă o secvenţă semnal de 18 aminoacizi.

CS se sintetizează în celulele epiteliale ale mucoaselor. După prelucrarea în complexul Golgi (unde are loc glicozilarea), CS migrează în citoplasmă pentru a fi integrată în plasmalema bazală şi laterală a celulelor. Sinteza CS este independentă de IgA. La noul născut apare în săptămâna a 8-a (înainte de apariţia plasmocitelor). Este prezentă la indivizii fără IgA în secreţii.

Funcţiile componentei secretoare. CS este receptor pentru moleculele dimere şi polimere de IgA şi IgM, care au legat lanţul J. Legarea lanţului J pare să determine o schimbare conformaţională a acestor molecule. Moleculele de IgA secretate ca monomeri, ca şi polimerii care nu au legat lanţul J nu se pot complexa cu CS şi trec în circulaţie.

IgA dimeric trebuie să ajungă în contact cu celulele epiteliale, pentru a fi transportat la suprafaţa mucoasei epiteliale. Teoretic, IgA polimeric poate veni în contact cu celulele epiteliale care conţin CS, pe una din următoarele două căi:

– difuzia IgA prin ţesutul conjunctiv adiacent plasmocitelor din lamina proprie a mucoasei, unde are loc sinteza;

– translocaţia sa din circulaţie la nivelul capilarelor mucoasei.

CS este inserată în membrana laterobazală a celulei epiteliale. Din această poziţie, prin fragmentul său extracelular, CS leagă dimerii de IgA care conţin lanţul J. Nu se cunoaşte mecanismul acestei legări. Unul din mecanismele de interacţiune presupune că CS s-ar înfăşura în jurul dimerului de IgA, extinzându-se de la o regiune balama la cealaltă, mărind astfel rezistenţa la proteoliză a dimerului. Complexul format este endocitat în vezicule de pinocitoză şi este eliberat pe faţa luminală a celulelor epiteliale, în secreţia lor externă. Un astfel de transport are loc în celulele epiteliale ale mucoasei tubului

digestiv, ale mucoasei bronşice, la nivelul epiteliului vezicii biliare şi ale ductului biliar, ale acinilor glandelor mamare, pancreatici şi salivari.

Rolul CS în transportul IgA la suprafaţa mucoaselor este argumentat de faptul că bolnavii cu deficit al sintezei sale nu au Ig A în secreţii, deşi nivelul de IgA seric este normal.

Transportul transepitelial al sIgA este asociat cu o pierdere continuă de receptori, care, spre deosebire de alţi receptori, după exocitoză la suprafaţa celulei epiteliale nu sunt recirculaţi şi nici nu se refac prin resinteză.

FUNCŢIILE EFECTOARE ALE sIgA

Funcţia biologică esenţială a sIgA este apărarea organismului faţă de antigenele moleculare care ar putea fi înglobate la nivelul mucoaselor (în principal cea digestivă) şi de a asigura protecţia faţă de agenţii patogeni care tind să pătrundă de la exterior pe calea mucoaselor digestive, respiratorie, genito–urinară.

sIgA formează complexe cu antigenele adsorbite la suprafaţa mucoaselor, având rol în *excluderea imună* a acestora.

sIgA se pare că nu recunoaşte specific antigenele celulare bacteriene, dar realizează imobilizarea şi aglutinarea lor, oprind pătrunderea lor în organism. sIgA se leagă cu glicoproteinele de suprafaţă ale celulei bacteriene şi diminuă aderenţa ei, împiedicând colonizarea mucoaselor.

sIgA blochează legarea virusurilor de receptorii celulari şi neutralizează efectul toxinelor produse de microorganisme (botulinică, tetanică, holerică).

Prezenţa sIgA în colostru şi în lichidul amniotic sugerează rolul său foarte important în conferirea imunităţii pasive a noului născut, atât la om cât şi la animale. Rezistenţa noilor născuţi hrăniţi natural este mult superioară comparativ cu a celor hrăniţi artificial. Concentraţia IgA în colostrul uman este foarte înaltă în primele 24–48 de ore de lactaţie (6–88 mg/ml) şi diminuă brusc datorită diluţiei într-un volum secretor mult sporit. Concentraţia foarte mare a IgA în colostru se datorează eliberării unor cantităţi mari într-un volum mic de secreţie. Glanda mamară are un număr relativ mic de celule producătoare de anticorpi, deoarece nu este stimulată antigenic. Originea IgA în secreţia mamară are două surse: o sinteză locală foarte intensă în plasmocitele din ţesutul conjunctiv subiacent epiteliului acinilor glandulari, sau transportul IgA din sânge.

IgA din secreţia mamară nu este transportată, la nivelul mucoasei digestive, în circulaţia noului născut, decât într-o mică măsură în primele ore de viaţă. Efectul protector, antiinfecţios al IgA se realizează prin faptul că rămâne legată de celulele epiteliului mucoasei digestive şi blochează aderenţa

microorganismelor şi virusurilor. La alte specii de mamifere, IgA din secreţia lactată este transportată foarte activ în circulaţia noului născut.

IgA nu este transferată prin placentă. Sângele noului născut nu conţine IgA. Nivelul IgA al adultului este atins la 9–10 luni.

IMUNOGLOBULINA M

IgM este produsă sub două forme: *monomeră*, legată de membrane şi *polimeră*, liberă în ser

Caracteristica sa moleculară este prezenţa unui lanţ greu al izotipului μ, alcătuit din 576 aminoacizi (452 în regiunea C). IgM conţine 5 grupări prostetice oligozaharidice. Lanţul μ are 5 domenii: unul variabil şi 4 constante (CH_1–CH_4).

IgM legat de membrană are în plus, o secvenţă COOH terminală, hidrofobă formată din 41 aminoacizi, care întrerupe transportul lanţului μ prin membrană şi ancorează molecula în structura plasmalemei.

IgM serică are structura unui pentamer $(L_2\mu_2)_5$, cu greutatea moleculară de 950 kD. Lanţul μ al IgM serice prezintă o secvenţă C-terminală de 20 aminoacizi, care facilitează traversarea membranei în cursul sintezei.

Fiecare pentamer conţine un lanţ polipeptidic J, bogat în cisteină, foarte acid, cu rol în polimerizarea monomerilor. Cele 5 unităţi monomere sunt aşezate radiar, cu regiunile Fc orientate spre centru şi regiunile Fab spre exterior, unite prin punţi S–S formate între domeniile CH_3 şi prin lanţul J. La microscopul electronic, pentamerul IgM are aspect de stea cu 5 braţe, dispuse în jurul unui disc central. Fiecare braţ are forma literei Y. Braţele pot lua poziţii diferite, ceea ce denotă existenţa unei zone mobile pentru fiecare subunitate. Fiecare unitate monomerică este mobilă la nivelul articulaţiei de discul central.

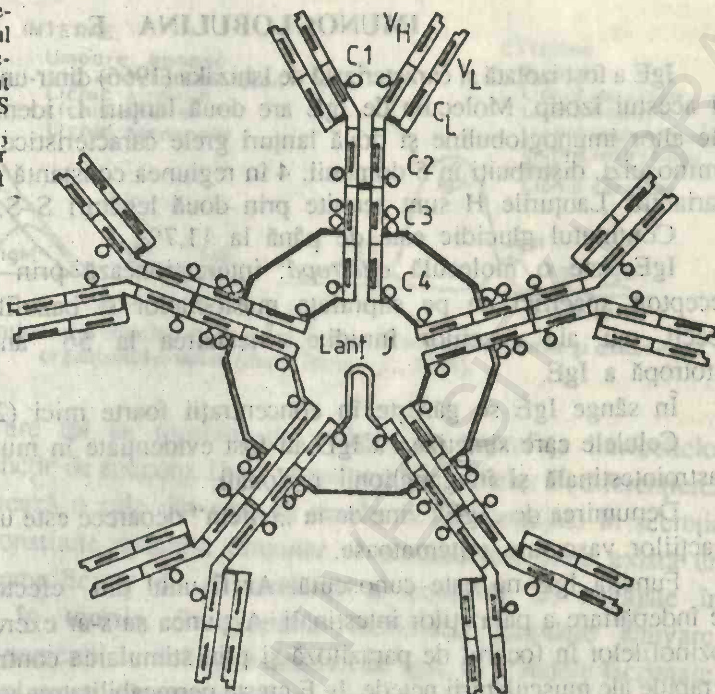
Funcţiile IgM. IgM este receptor major de antigen pe suprafaţa limfocitelor B mature;

IgM seric (polimer) are funcţii aglutinante, fiind de 1000 de ori mai eficient decât monomerii bivalenţi de imunoglobulină. Reprezintă 5–10% din cantitatea totală de anticorpi (84–170mg%);

IgM activează complementul, efect urmat de distrugerea litică a antigenului celular şi ingestia sa de către macrofage. De aceea IgM este foarte eficient în apărarea faţă de bacteriemii şi faţă de toxine (difterică, tetanică, botulinică, toxina din veninul de şarpe);

IgM sunt anticorpi opsonizanţi.

Fig. 12. Structura pentamerică a moleculei de IgM. Lanţul J leagă doi monomeri. Catenele H sunt unite prin punţi S–S între domeniile CH_3 ale monomerilor adiacenţi (după Roitt şi colab., 1985).



Afinitatea IgM (forţa de legare dintre un epitop şi un paratop al fiecărui situs activ al polimerului) poate să fie slabă, dar *aviditatea* globală (energia medie a interacţiunii de legare a IgM cu un antigen care posedă epitopi multipli şi diferiţi) este foarte mare faţă de antigenele solubile complexe şi faţă de celule, ambele categorii având epitopi repetitivi. Aviditatea condiţionează eficienţa maximă a IgM în legarea antigenului.

IgM apare foarte precoce la noul născut şi este primul care se sintetizează în răspunsul imun primar: apare la 3 zile după administrarea antigenului, atinge concentraţia maximă la 5–6 zile şi este înlocuit în ziua a 10-a de IgG. Trece greu sau nu trece în lichidele interstiţiale şi nici prin bariera placentară.

IgM reprezintă forma sub care se găsesc anticorpii naturali ai grupelor sanguine (aglutininele α şi β). Nivelul IgM seric al adultului este atins la 10 luni.

Se pare că IgM este clasa de imunoglobuline cea mai bine păstrată în evoluţie.

IMUNOGLOBULINA E

IgE a fost izolată şi caracterizată de Ishizaka (1966) dintr-un mielom producător al acestui izotip. Molecula de IgE are două lanţuri L identice cu lanţurile L ale altor imunoglobuline şi două lanţuri grele caracteristice (Hε) cu câte 550 aminoacizi, distribuiţi în 5 domenii: 4 în regiunea constantă şi unul în regiunea variabilă. Lanţurile H sunt reunite prin două legături S–S, în domeniul C_2.

Conţinutul glucidic este de până la 11,7%.

IgE este o moleculă *citotropă*: interacţionează prin segmentul Fc cu receptori specifici de pe suprafaţa mastocitelor şi bazofilelor ale aceleiaşi specii sau ale speciilor înrudite. Încălzirea la 56° anulează activitatea citotropă a IgE.

În sânge IgE se găseşte în concentraţii foarte mici (250 ng/ml).

Celulele care sintetizează IgE au fost evidenţiate în mucoasa respiratorie, gastrointestinală şi în ganglionii regionali.

Denumirea de „IgE" vine de la „*e*ritem" deoarece este unul din mediatorii reacţiilor vasculare eritematoase.

Funcţia IgE nu este cunoscută. Ar fi unul din efectorii mecanismelor de îndepărtare a paraziţilor intestinali. Acţiunea sa s-ar exercita prin atragerea eozinofilelor în focarul de parazitoză şi prin stimularea contracţiilor prelungite şi rapide ale musculaturii netede. Ig E creşte permeabilitatrea vasculară şi permite anticorpilor serici şi celulelor albe să penetreze mucoasa şi să participe la reacţiile de apărare.

Mastocitele şi bazofilele care leagă IgE se activează. Activarea ar fi rezultatul formării unor punţi între două molecule de IgE adiacente, care au legat un antigen multivalent. IgE ar avea numai rolul de a reuni receptorii segmentului Fc. Reunirea ar fi sursa efectivă a semnalului de activare, a cărei consecinţă este eliberarea histaminei şi serotonici, SRSA (un factor chemotactic pentru eozinofile). Eozinofilele lizează parazitul.

Concentraţia serică a IgE creşte în parazitoze şi alergii (în astmul alergic, la 1500 ng/ml). IgE este implicată în reacţiile de hipersensibilitate imediată, de tip anafilactic, inclusiv la om.

IgE nu este transferată prin placentă. Nivelul seric de la adult este atins la 10–15 ani.

IMUNOGLOBULINA D

IgD se găseşte în cantitate foarte mică în sânge (0,2% din cantitatea totală de imunoglobuline). Este monomeră. Lanţurile L nu au deosebiri faţă de ale altor imunoglobuline, iar lanţurile H aparţin izotipului δ. Lanţul H are 4 domenii: 3 în regiunea constantă şi unul în regiunea variabilă.

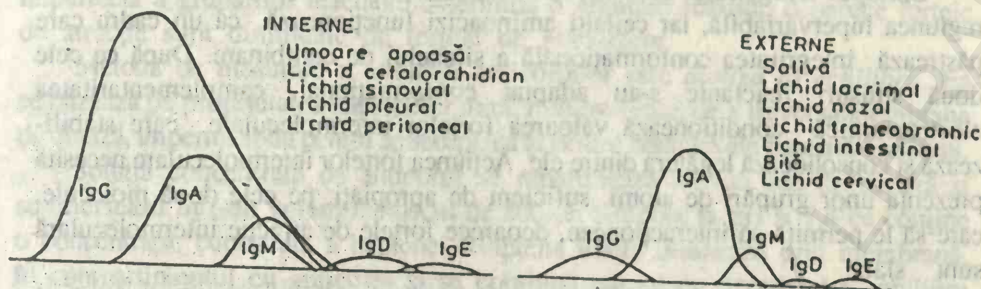


Fig. 13. Distribuţia cantitativă a claselor de imunoglobuline în secreţiile interne şi externe ale organismului uman (după Tomasi jr., 1984).

Funcţii. IgD are rol de receptor de antigen pe suprafaţa limfocitelor B mature. Nu are funcţie de anticorp. După stimularea limfocitelor B, diferenţierea izotipurilor nu urmează o cale din care să rezulte celule angajate în secreţia IgD. Excepţia o constituie sistemul imunitar al mucoaselor, unde există un număr mic dar semnificativ de descendenţi ai celulelor B, angajate în secreţia de IgD: în tonsile, în glandele lacrimale, glandele salivare, glandele nazale. La pacienţii cu deficit al sintezei de IgA, în glandele lacrimale, parotide şi nazale, plasmocitele producătoare de IgA sunt înlocuite cu celule producătoare de IgD, iar în mucoasa intestinală, cu celule producătoare de IgG şi IgM.

Ig D nu este o imunoglobulină a secreţiilor. Nu este mai concentrată în secreţii decât în ser. Nu se cunoaşte mecanismul său de transport.

La noul născut se găseşte în concentraţie mai mare în ser. La adult ar putea să aibă origine fetală.

INTERACŢIUNEA ANTIGEN–ANTICORP

Interacţiunile antigen-anticorp sunt totdeauna reversibile şi sunt prototipul interacţiunilor dintre macromolecule.

Factorii care condiţionează interacţiunea antigen–anticorp sunt:

– *complementaritatea structurală* dintre determinantul antigenic şi situsul de combinare al anticorpului. Cele două structuri trebuie să se adapteze tridimensional. Complementaritatea a fost gândită în termeni structurali, pe principiul cheie-broască:

– *complementaritatea electrochimică*, a grupărilor reactante.

Epitopul antigenului se combină cu paratopul, de fapt cu aminoacizii din regiunea hipervariabilă, iar ceilalți aminoacizi funcționează ca un cadru care păstrează integritatea conformațională a situsului de combinare. După ce cele două situsuri reactante s-au adaptat conformațional, complementaritatea electrochimică condiționează valoarea forțelor intermoleculare care stabilizează și consolidează legătura dintre ele. Acțiunea forțelor intermoleculare necesită prezența unor grupări de atomi, suficient de apropiați, pe cele două molecule, care să le permită să interacționeze, deoarece forțele de atracție intermoleculară sunt slabe.

La interacțiunea antigen-anticorp participă următoarele tipuri de legături necovalente: *legături de H*, legături *hidrofobe*, *forțe Van der Waals* și forțe *electrostatice*. Luate separat, fiecare are o energie de legare inferioară legăturii covalente, dar datorită numărului lor mare, împreună implică o rezultantă suficient de mare a energiei de legare. Forțele interacțiunii antigen-anticorp nu sunt specifice. Ele nu diferă de cele care mediază interacțiunea dintre proteine sau dintre proteinele enzime și substratul lor.

Interacțiunea grupărilor reactante ale reacției antigen anticorp este definită de doi parametri: *afinitatea* și *aviditatea*.

Afinitatea anticorpilor măsoară forța de legare dintre un determinant antigenic și situsul complementar de legare al unui anticorp specific. Afinitatea reprezintă rezultanta forțelor de atracție și de respingere care mediază interacțiunea celor doi reactanți. Forța acestor interacțiuni se măsoară într-o reacție a unui antigen monovalent neprecipitant (a unei haptene) cu anticorpii specifici. O afinitate înaltă implică structuri complementare perfecte, în timp ce complementaritatea

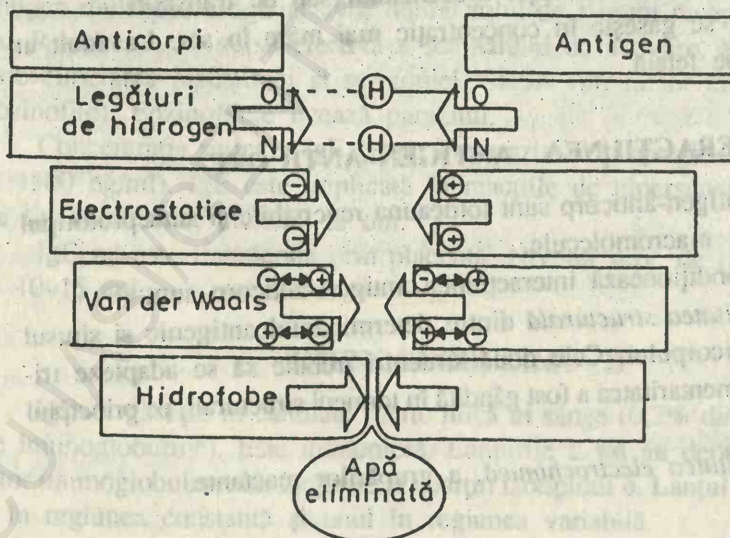


Fig. 14. Reprezentarea schematică a forțelor de atracție intermoleculare, implicate în legarea antigenului de anticorp (după Roitt și colab., 1985).

imperfectă a grupărilor reactante determină o afinitate scăzută, deoarece forțele de atracție sunt diminuate de forțele de respingere.

Metoda de măsurare a afinității anticorpilor este *dializa la echilibru*. Ea se bazează pe proprietatea haptenelor mici, monovalente, de a traversa membrana de dializă, impermeabilă pentru anticorpi, ca și pentru complexele haptenă-anticorpi.

Soluția concentrată de anticorpi se repartizează într-un sac de dializă și se imersează într-un volum cunoscut de soluție tampon, la pH = 7,4 ce conține o concentrație cunoscută a haptenei. Haptena liberă difuzează prin membrană, în compartimentul cu anticorpi și se combină parțial cu aceștia. La echilibru se măsoară concentrația haptenei libere de la exterior, (egală cu concentrația haptenei *libere* din interior). Concentrația totală a haptenei în sacul de dializă este mai mare, deoarece o parte din ea este legată de anticorpi.

Diferența dintre concentrația inițială și cea finală a haptenei, în compartimentul exterior măsoară afinitatea ei de legare cu anticorpii specifici, în condițiile unui exces de molecule de haptenă care favorizează disocierea complexelor antigen-anticorp.

Aviditatea este un parametru care rezultă din multivalența antigenului. Cele mai multe antigene posedă mai mult decât un determinant antigenic. De exemplu, celulele bacteriene au pe suprafață un număr de determinanți antigenici repetitivi, iar antigenele proteice au totdeauna un număr necunoscut de determinanți antigenici diferiți. Polizaharidele au determinanți antigenici repetitivi. Un astfel de antigen multivalent se combină cu mai multe situsuri ale anticorpilor corespunzători. Energia de legare a epitopilor multipli cu situsurile anticorpilor specifici este mult superioară comparativ cu energia separată a fiecărui situs de combinare. Aviditatea caracterizează energia medie de legare a unui antigen multivalent cu anticorpii corespunzători. Aviditatea măsoară *forța rezultantă* a afinității dintre epitopii multipli și paratopi. Disocierea complexelor antigen-anticorp, formate de antigenele multivalente este dificilă deoarece este necesară ruperea tuturor legăturilor existente.

Afinitatea furnizează date cu privire la natura fizico-chimică a reacției antigen-anticorp, iar aviditatea este semnificativă pentru antigenele naturale multivalente.

Afinitatea și aviditatea condiționează proprietățile fiziologice ale anticorpilor. Cei cu afinitate mare sunt mai eficienți în reacțiile biologice: în protecția antibacteriană, în reacția de precipitare. Complexele antigen-anticorp, cu afinitate mică a anticorpilor persistă în circulație și se depun pe membrana bazală a glomerulului renal. Cele ce conțin anticorpi cu afinitate mare se elimină rapid, fără efect notabil asupra funcției renale.

BAZELE MOLECULARE ALE REACŢIILOR IMUNE ÎNCRUCIŞATE

Trăsătura dominantă a reacţiilor antigen-anticorp este *specificitatea*. În general, anticorpii reacţionează numai cu antigenul *homolog* (folosit la imunizare), dar există şi excepţii, în cazul cărora anticorpii unui ser imun reacţionează şi cu antigene *heterologe*, altele decât cel folosit la imunizare, dar înrudite chimic cu acesta.

Molecula de imunoglobulină, cu o structură tridimensională unică poate să lege un număr de determinanţi antigenici *diferiţi*, similari ca structură chimică cu antigenul declanşator, sau cu structură chimică distinctă. Energia interacţiunii anticorpilor cu antigenele heterologe este mai mică. Această posibilitate de legare stă la baza *multispecificităţii* imunoglobulinelor sub aspect *molecular* şi a reacţiilor *încrucişate* sub aspect *serologic*.

Din punct de vedere *molecular*, posibilitatea legării unor epitopi diferiţi, cu un situs de combinare unic în ceea ce priveşte configuraţia sa spaţială se explică prin faptul că la nivelul subunităţilor sale structurale se leagă epitopi diferiţi, cu dimensiuni mai mici şi configuraţie complementară acestora.

O altă explicaţie de ordin molecular a reacţiilor încrucişate o constituie *heterogenitatea* configuraţiei spaţiale a situsului de combinare a anticorpilor unui ser imun. Aceasta decurge din faptul că nu există nici un antigen care să aibă un singur epitop. Cea mai simplă haptenă poate induce sinteza câtorva tipuri conformaţionale de situsuri de combinare, fiecare cu o altă specificitate. Heterogenitatea specificităţii de combinare a anticorpilor unui ser măreşte şansa unei reacţii cu antigene heterologe.

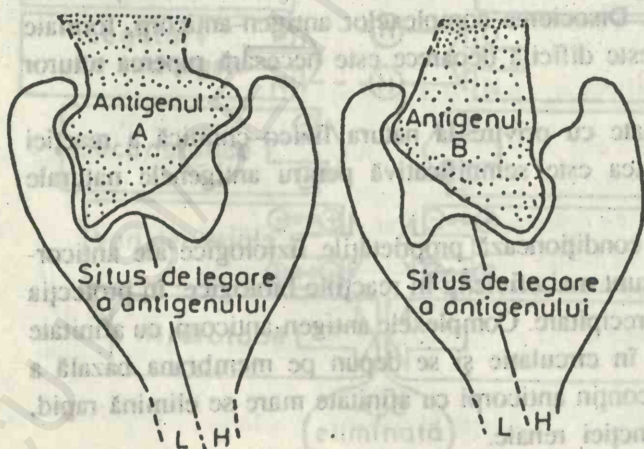


Fig. 15. Reprezentarea schematică a fenomenului de multispecificitate a moleculei de anticorp (după Hood şi colab., 1984).

Din punct de vedere serologic, reactivitatea încrucişată este de două tipuri:

– reactivitate încrucişată *adevărată*, sau de tip I, corespunde capacităţii unui situs de combinare al unei molecule de anticorp, de a lega două antigene diferite, cu afinităţi diferite. Pentru proteine, reactivitatea încrucişată este determinată de mici modificări ale secvenţei aminoacizilor, care induc uşoare modificări conformaţionale;

– reactivitatea încrucişată de tip II este caracteristică antiserurilor cu o populaţie foarte heterogenă de anticorpi şi depinde de capacitatea unui antigen înrudit cu cel homolog de a se combina cu o subpopulaţie de anticorpi a amestecului heterogen din ser.

Reacţiile încrucişate au fost iniţial observate în cazul antigenelor celulare bacteriene, datorită complexităţii lor antigenice. Oricare celulă bacteriană conţine un număr mare de antigene distincte (flagelare, somatice, capsulare etc). Antiserul specific va conţine un amestec de anticorpi faţă de diferiţii săi constituienţi antigenici, unii dintre ei fiind comuni mai multor linii bacteriene.

Raţionamentul este valabil şi pentru moleculele mari. Ele conţin mai mulţi determinanţi antigenici, care pot fi comuni organismelor diferitelor specii.

Reacţiile încrucişate sunt mai comune pentru antigenele care au epitopi de natură glucidică. De exemplu antigenele de grup sanguin A şi polizaharidul de *Streptococcus pneumoniae* reacţionează cu antiserul faţă de oricare dintre ele, iar antigenele sanguine de grup B reacţionează cu anticorpii obţinuţi faţă de unele tulpini de *E. coli*. Bumbacul este înrudit structural cu polizaharidul de *S. pneumoniae*, tipurile 3 şi 8 (în virtutea conţinutului comun de acid celobiuronic). Antiserurile lor dau reacţii încrucişate reciproce.

Antigenele proteice din surse taxonomice înrudite dau reacţii încrucişate. De exemplu, antiserul faţă de albumina de ou de găină precipită albumina din oul de raţă. Reacţii încrucişate dau albumina serică bovină şi equină sau fibrinogenul uman şi cel bovin. Sunt cunoscute reacţiile încrucişate ale anticorpilor faţă de insulina bovină, cu insulina de porc, oaie, om, balenă. Moleculele de insulină de la diferite specii prezintă diferenţe structurale foarte mici (la secvenţele 8, 9, 10);

		8	9	10
Insulina:	bovină	Ala	Ser	Val
	oaie	Ala	Gly	Val
	cal	Thr	Gly	Ileu
	porc	Thr	Ser	Ileu

Reacţiile încrucişate reciproce sunt frecvente dar nu obligatorii. De exemplu, serul imun de iepure anti-albumină serică bovină precipită ovalbumina, dar reacţia inversă nu se produce.

BAZELE GENETICE
ALE DIVERSITĂȚII ANTICORPILOR

Sistemul imunitar al vertebratelor produce anticorpi cu o mare diversitate a specificității situsului de combinare (10^8–10^9), tipuri diferite care leagă tot atâția epitopi antigenici. Înțelegerea determinismului genetic al acestei diversități a întârziat mult față de alte aspecte ale funcționalității sistemului imunitar.

Prima teorie modernă asupra specificității anticorpilor a fost teoria „lanțurilor laterale" a lui Ehrlich (1900). Lanțurile laterale sunt receptori preformați situați pe membrana limfocitelor. Legarea antigenului pe receptorul limfocitului, va stimula celula să sintetizeze molecule identice cu receptorul de antigen, care trec în ser ca anticorpi. Teoria lui Ehrlich a anticipat teoria selecției clonale, precum și ideea că sistemul imunitar poate genera receptori cu mult înainte de a veni în contact cu antigenul, care stau în așteptarea acestuia și au structură comună cu aceea a anticorpilor. Ehrlich consideră, însă, în mod eronat, că o celulă posedă receptori pentru mai multe antigene. Teoria sa a fost abandonată când Landsteiner a arătat că formarea anticorpilor are loc și față de antigenele artificiale (conjugate haptenă-proteină) și astfel specificitatea anticorpilor a fost explicată prin *teoriile instructive* (Breinl și Haurowitz, 1930). Teoriile atribuiau rol important grupărilor determinante de specificitate. Acestea ar pătrunde în celula formatoare de anticorpi și ar acționa ca *matriță* pentru a imprima polipeptidelor în curs de sinteză, o configurație spațială complementară.

Aceste teorii au fost infirmate după evidențierea diversității enorme a moleculelor de anticorpi care se sintetizează după stimularea cu un antigen, precum și de faptul că o celulă B și descendenții săi produc anticorpi cu o specificitate unică față de un epitop.

În 1959, Mc Farlane Burnet a formulat *teoria selecției clonale*. Teoria postulează că sistemul imunitar este reprezentat de un număr uriaș de *clone de limfocite*, carespunzătoare unui număr egal de epitopi. Cloma este o populație de celule, genetic identice, descendente ale unei singure celule de origine. Diversitatea clonelor este reflectată în specificitatea fiecăreia de a recunoaște un anumit epitop și este generată în timpul diferențierii celulelor limfoide din celulele de origine. Toate celulele unei clone poartă pe suprafața lor, molecule identice de imunoglobulină, care funcționează ca receptori specifici de antigen. După interacțiunea cu antigenul, receptorul va fi produs și secretat ca anticorp. Epitopii antigenelor complexe *selecționează* din această colecție imensă, clonele

de limfocite care au receptori complementari din punctul de vedere al configurației spațiale și determină proliferarea și diferențierea lor în celule producătoare de anticorpi. Toate celulele clonei au aceiași specificitate pentru antigen. Sistemul imunitar funcționează pe principiul „gata făcut", astfel încât problema diversității anticorpilor devine de ordin genetic.

Teoria selecției clonale este argumentată de câteva dovezi experimentale:

– pe suprafața celulelor imunocompetente există receptori pentru diferite antigene: numai 1–2% din limfocite leagă albumina serică bovină (sau alte antigene). Numărul celulelor care leagă un anumit antigen crește semnificativ după imunizarea cu antigenul respectiv;

– un limfocit produce anticorpi cu o *singură specificitate*, față de un singur epitop. Faptul că inițial se produce IgM și ulterior IgG nu este un contraargument, deoarece anticorpii celor două clase au regiuni variabile identice și aceiași specificitate de legare cu epitopul;

– clona de celule cu specificitate pentru un antigen se poate elimina selectiv prin pasajul celulelor pe o coloană de afinitate, de bile de sticlă tapetate cu antigen. Cele care au receptori pentru antigen aderă de coloană, iar celelalte trec, ceea ce denotă că limfocitele sunt programate să răspundă la un antigen, înainte de a se întâlni cu el, prin receptorii lor specifici preformați;

– incubarea limfocitelor cu un antigen puternic radiomarcat, produce moartea numai a celulelor care îl leagă specific.

Susținută de dovezi experimentale, teoria selecției clonale este acceptată. Se pune problema modalității de codificare genetică a sintezei unei mari diversități moleculare de anticorpi. Potențialului imens al unui organism de a sintetiza milioane de tipuri de molecule diferite de anticorpi, ar trebui să-i corespundă un număr egal de gene codificatoare. Generarea potențialului uriaș de diversitate genetică s-a explicat în diferite moduri:

– *teoria liniei germinale* consideră că genele care codifică sinteza regiunilor VL și VH se găsesc în celula germinală. În genomul fiecărui individ s-ar găsi un număr imens de cistroni, care s-ar transmite ereditar. Pentru cele 10^8–10^9 specificități de legare ale moleculelor de anticorpi, ar exista tot atâtea gene codificatoare. Teoria nu explică modalitățile de păstrare în evoluție, a acestui număr de gene și nici posibilitatea sintezei anticorpilor cu specificitate față de antigenele sintetice;

– *teoria recombinărilor somatice* presupune existența unui număr limitat de cistroni codificatori ai regiunilor V ale moleculei de anticorpi, în linia germinală. Diversificarea tipurilor de anticorpi s-ar realiza prin recombinări somatice între

un număr limitat de cistroni, asociate cu diviziunile celulare în cursul diferenţierii limfocitelor;

– *teoria mutaţiilor somatice* consideră că repertoriul genelor pentru sinteza imunoglobulinelor este construit de novo în cursul dezvoltării sistemului imunitar, pornind de la un număr mic de gene ale liniei germinale, prin mutaţii la nivelul celulelor somatice. Selecţia pozitivă (păstrarea viabilităţii clonelor cu receptori pentru antigenele exogene) s-ar face sub influenţa antigenelor care selecţionează şi stimulează proliferarea celulelor mutante, ce sintetizează anticorpi cu situs de combinare complementar. Teoria presupune persistenţa în organism, pentru perioade lungi de timp, a unui număr mare de antigene, ceea ce este improbabil;

– *teoriile mixte* presupun existenţa unui număr limitat de cistroni V în celulele liniei germinale. Diversificarea imensă a potenţialului de codificare şi sinteză s-ar face prin recombinări somatice între aceşti cistroni, în timpul diviziunilor celulare, declanşate de recunoaşterea şi stimularea antigenică.

Ipoteza lui Dreyer şi Bennett (1965) explică diversitatea anticorpilor prin însăşi particularităţile lor de structură. Existenţa unei singure gene codificatoare pentru regiunile V şi C ale moleculei de imunoglobulină este improbabilă, deoarece nu este posibil ca o genă să sufere atâtea variaţii genetice corespunzătoare extremităţii NH_2 a catenei polipeptidice şi să rămână constantă pentru zona codificatoare a extremităţii COOH. Nu se cunoaşte nici o situaţie în care segmentul ADN corespunzător regiunii constante a unei proteine să fi rămas nemodificat, iar cel codificator al regiunii variabile să fie expus mutaţiei cu o frecvenţă atât de mare.

Singura modalitate logică este să presupunem că molecula de imunoglobulină este codificată de *mai multe gene* separate – *cel puţin două* – una pentru regiunea variabilă şi una pentru regiunea constantă. În celulele embrionare limfoide ar exista câteva *sute de gene*, codificatoare ale regiunii variabile şi *o genă* pentru regiunea constantă care s-ar asocia la întâmplare în cursul diferenţierii limfocitelor B. O moleculă de imunoglobulină funcţională s-ar forma ori de câte ori recombinarea genetică aduce în limfocitul precursor al plasmocitului, o genă V în apropierea genei C corespunzătoare. Astfel s-ar forma cuplurile de gene funcţionale VL–CL şi VH–CH, corespunzătoare celor două lanţuri.

Ipoteza venea în contradicţie cu câteva dogme ale biologiei celulare şi moleculare:

– o genă codifică un polipeptid;

– constanţa genomului pe toată perioada de dezvoltare a unui organism;

– imposibilitatea rearanjării genelor într-o celulă somatică;

– continuitatea informaţiei genetice. Din aceste motive, ipoteza nu a fost acceptată.

Teoria genelor multiple codificatoare pentru o moleculă de imunoglobulină a fost confirmată prin tehnica cineticii de hibridare (Leder şi Swan, 1971). Autorii au arătat că atât în *celulele limfoide embrionare* cât şi în *celulele tumorii de mielom*, regiunea *constantă* a fiecărei catene a moleculei de imunoglobulină este codificată de *o singură genă*, iar regiunea *variabilă* este codificată de *mai multe gene*.

Prin tehnica hibridării, s-a comparat distribuţia genelor codificatoare în ADN din două surse:

– dintr-o tumoră de mielom de şoarece, ce secretă un lanţ *k*;

– din celulele limfoide embrionare (imature) de şoarece, ce nu sintetizează imunoglobuline.

ADN din ambele surse a fost clivat cu enzime de restricţie, în fragmente separate ulterior prin electroforeză.

Fragmentele codificatoare ale lanţului *k* au fost identificate prin hibridare cu ADNc (complementar), obţinut prin transcrierea inversă a ARNm al lanţului *k*. S-au folosit două fragmente de ARNm ale lanţului *k*;

– un fragment pentru lanţul *k* întreg (cu domeniile Vk şi Ck);

– un fragment corespunzător jumătăţii 3' a ARNm pentru domeniul Ck.

În proba cu ADN obţinut din limfocitele embrionare, ADNc pentru fragmentul Ck a hibridat cu un fragment ce conţine gena Ck, iar ADNc pentru întregul lanţ *k* a hibridat atât cu fragmentul genei Ck, cât şi cu un alt fragment de ADN rezultat prin clivarea cu enzimele de restricţie, care conţine, probabil, gena Vk. *În celulele embrionare, cele două gene codificatoare ale lanţului k se găsesc situate la distanţă, în fragmente de restricţie diferite.*

În proba cu ADN obţinut din celulele de mielom, ambele probe de ADNc, corespunzătoare domeniului Ck şi lanţului întreg Vk şi Ck au hibridat într-un *singur fragment. În limfocitele mature, cele două gene codificatoare ale lanţului k se găsesc în imediată vecinătate, în acelaşi fragment de restricţie.*

În esenţă, genele funcţionale pentru sinteza imunoglobulinelor sunt rezultatul rearanjării prin procese de *translocaţie*, a unor segmente genice mici, moştenite în ADN al liniei germinale. Rearanjările au loc în limfocite, pe măsură ce ele se diferenţiază din celule imature precursoare, în limfocite B producătoare de anticorpi.

Mecanismele genetice de tranlocaţie, generatoare ale uriaşei diversităţi a specificităţii de combinare a anticorpilor au deschis o nouă cale a înţelegerii modului în care informaţia genetică poate să fie amplificată. Ele sunt active în limfocitele B, dar şi în limfocitele liniei T, în care codifică o diversitate asemănătoare a receptorului de antigen al acestor celule, însă nu au fost

au fost identificate pentru alte gene. Singurul mecanism care aduce genele într-o structură genică coerentă, funcţională este reunirea (*translocaţia*) prin recombinare genetică a celor două secvenţe ADN, pentru a forma o genă activă L şi o genă activă *H*.

Polipeptidele *L* şi *H* sunt codificate de 3 grupuri de gene nelincate:

– grupul genelor *H* pentru sinteza lanţurilor γ, μ, α, δ, ε (situate pe cromosomul 14 la om şi 12 la şoarece);

– grupul genelor *k* pentru sinteza lanţului *Lk* (situate pe cromosomul 2 şi respectiv 6);

– familia genelor λ pentru sinteza lanţului L λ (situate pe cromosomul 22 şi respectiv 16).

Fiecare din aceste familii cuprinde un număr controversat de gene codificatoare ale regiunii variabile, situate separat de gena codificatoare a regiunii constante a moleculei de imunoglobulină.

Genele pentru catena L a imunoglobulinei de şoarece s-au studiat prin clonarea fragmentelor de ADN într-un fag ce se replică în celulele de *E. coli*. S-a obţinut astfel o cantitate suficient de mare de ADN al genelor codificatoare pentru lanţurile Lk şi Lλ, atât din limfocitele embrionare, cât şi din celulele de mielom, producătoare de imunoglobuline.

Gena codificatoare a lanţului λ este formată din 4 segmente separate, ordinea lor în direcţia 5'–3' fiind Lλ, Vλ, Jλ şi Cλ.

Segmentul genic Lλ codifică 15–20 aminoacizi ai secvenţei leader de la extremitatea N-terminală a lanţului polipeptidic. Această secvenţă este clivată pe măsură ce lanţul străbate membrana reticulului endoplasmic şi lipseşte din molecula de imunoglobulină matură.

Segmentul genic Vλ codifică cea mai mare parte a regiunii variabile a lanţului λ, specificînd legarea aminoacizilor de la poziţia 1 la 97.

Segmentul genic Jλ codifică restul regiunii variabile, adică aminoacizii între poziţiile 98–110 (Jλ = joining – legare).

Segmentul genic Cλ codifică regiunea constantă a lanţului L, între poziţiile 111–214.

Familia de gene codificatoare ale lanţului Lk este organizată asemănător cu a genelor Lλ: secvenţe leader Lk, aşezate în tandem cu cele circa 250 segmente genice Vk, 5 segmente Jk strâns legate între ele (din care unul este defectiv) şi la o distanţă de 1000 pb se găseşte un singur segment genic Ck.

Genele pentru catena H a imunoglobulinelor au o organizare similară celei a genelor lanţului L. Segmentele genice ale lanţului H sunt mai numeroase şi au o organizare mai complexă, deoarece conţin în plus, regiuni codificatoare notate cu D (diversity), intercalate între VH şi JH. Ele amplifică diversitatea

biochimică a anticorpilor. Sunt circa 12 segmente genice D, fiecare codificând 5–15 aminoacizi. Ele conferă cea mai amplă variaţie biochimică a lanţului H.

Segmentele genice VH par a fi în număr de câteva sute. Fiecare segment VH este asociat cu segmentul LH, codificator al secvenţei leader. La şoarece sunt 200–300 segmente genice VH, 10–20 D, 4 gene JH şi 10 gene CH.

Genele CH, codificatoare ale regiunii constante ale claselor şi subclaselor de catene H se găsesc în ordinea: μ, δ, γ_3, γ_1, εφ, α_1, γ_2, γ_4, ε, α_2. εφ este nefuncţională.

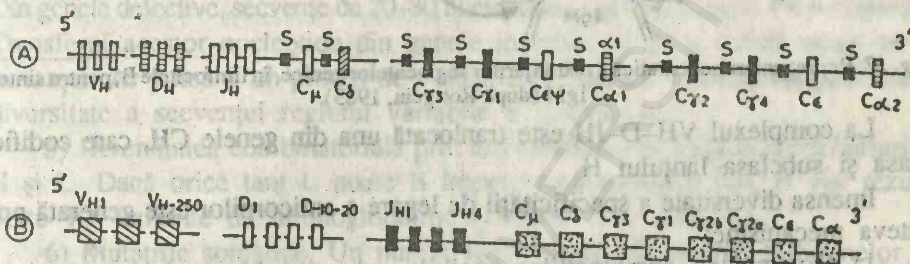


Fig. 16. Reprezentarea schematică a ordinii genelor în limfocitele embrionare, pentru regiunea constantă a catenei H la şoarece (A) şi la om (B). Regiunile încadrate în dreptunghiuri corespund exonilor. Discontinuităţile liniei care îi leagă marchează distanţe nucleotidice nedeterminate S = regiune de comutare (switch) (după Korsmeyer şi Waldmann, 1984).

Fiecare segment genic CH conţine mai mulţi exoni. Fiecare exon codifică un domeniu structural al moleculei de imunoglobulină.

Asamblarea genei active pentru catena L. Pentru a rezulta o genă funcţională Lk, unul din cele circa 250 segmente genice Vk se uneşte cu unul din cele 4 segmente genice funcţionale Jk, printr-un proces de recombinare probabilistică. Împreună cu gena Ck, ele formează ansamblul VJC, codificator al catenei Lk, transcris ulterior în ARN premesager. Prin procesul de clivare şi înădire, intronii sunt eliminaţi şi rezultă ARN pentru catena Lk. Se sintetizează lanţul polipeptidic, iar secvenţa leader este clivată în cursul transferului prin membrana reticulului endoplasmic.

Asamblarea genei active pentru catena H este similară asamblării genei active pentru catena L, dar mai complexă deoarece implică recombinarea a 3 regiuni distincte ale domeniului variabil: VH, D şi JH. Iniţial s-ar realiza legarea segmentelor D şi JH, urmată de translocarea uneia din genele VH în vecinătatea complexului D–JH. Rearanjările sunt posibile datorită secvenţelor de recunoaştere ale genelor V D J. De cele mai multe ori, rearanjările genice au loc intracromosomal şi foarte rar intercromosomal.

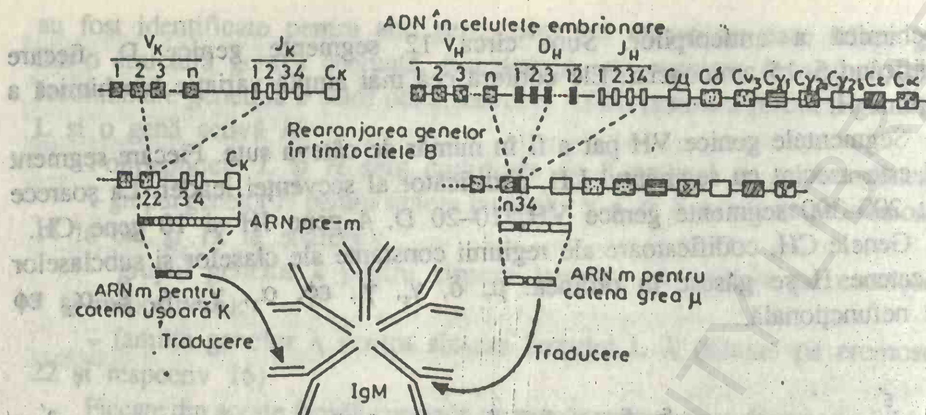


Fig. 17. Reprezentare schematică a rearanjărilor segmentelor genice, în limfocitele B, pentru sinteza IgM (după Rottgein, 1985).

La complexul VH–D–JH este tranlocată una din genele CH, care codifică clasa şi subclasa lanţului H.

Imensa diversitate a specificităţii de legare a anticorpilor este generată prin câteva mecanisme:

1) Diversitatea combinaţiilor posibile prin asamblarea întâmplătoare a segmentelor genice. Cele circa 250 segmente genice Vk şi cele 4 segmente funcţionale Jk produc circa 1000 (250 x 4) combinaţii Vk–Jk. Pentru gena H există posibilitatea unui număr superior de combinaţii VH–D–JH: circa 250 segmente VH, 12 segmente D şi 4 segmente JH (250 x 12 x 4).

2) Flexibilitatea joncţională a segmentelor genice. În momentul formării complexelor VH–D–JH sau VL–JL se produc deleţii, adiţii, substituţii de baze, care modifică 3 aminoacizi la fiecare joncţiune. Numărul variantelor biochimice creşte de 3 ori pentru lanţul L (1000 x 3) şi de 9 ori pentru lanţul H (12000 x 3 x 3).

3) Adiţii de nucleotide în regiunea N. Cea mai variabilă regiune a moleculei de anticorp este cea de a III-a regiune determinantă de complementaritate a

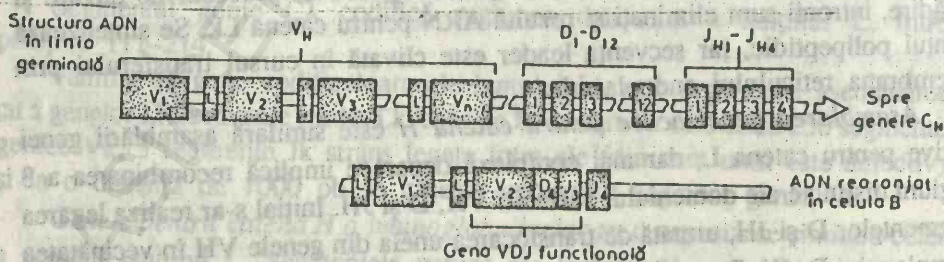


Fig. 18. Recombinarea segmentelor genice VDJ la şoarece şi formarea complexului genic funcţional VDJ în limfocitele B. Schema prezintă una din miile de alternative posibile de legare a unui segment VH, din cele câteva sute existente, cu un segment DH (din 12) şi un segment JH (din 4) (după Roitt şi colab., 1985).

lanţului H (aminoacizii 86–91), locul de unire a segmentelor genice VH–D şi D–JH. Aceste regiuni conţin secvenţe scurte variabile de aminoacizi denumite regiuni N. Ele sunt codificate de secvenţe de nucleotide adăugate de enzima terminal-transferază, activă în celulele limfoide imature, capabilă să adauge nucleotide la capătul 3' al catenei de ADN în curs de sinteză, fără să necesite matriţă.

4) Conversia genică este implicată în generarea diversităţii lanţurilor L ale anticorpilor de pui de găină. În mod surprinzător, regiunile variabile ale tuturor lanţurilor L sunt codificate de un singur segment genic (Vλ). Toate celelalte numeroase segmente genice Vλ sunt nefuncţionale (gene defective). Din genele defective, secvenţe de 20–30 nucleotide se găsesc în gena Vλ funcţională. Transferul acestor nucleotide din genele inactive, în gena activă unică nu se cunoaşte. Ar putea fi un proces de *transpoziţie*. Aceste secvenţe asigură marea diversitate a secvenţei regiunii variabile a lanţului L.

5) Diversitatea combinatorială prin împerecherea întâmplătoare a lanţurilor H şi L. Dacă orice lanţ L poate fi împerecheat cu orice lanţ H vor rezulta peste 10^8 variante de imunoglobuline (100000 H x 3000 L).

6) Mutaţiile somatice. Un număr foarte mare, de ordinul milioanelor de variante ale regiunii V pot să apară din substituţii unice de nucleotide în segmentul genic V. Acesta este fenomenul *hipermutaţiei* domeniilor variabile care este activat mai ales în condiţiile imunizării intense, ceeace explică creşterea afinităţii anticorpilor pentru epitopul stimulator.

Adiţiile şi deleţiile care însoţesc legarea segmentelor genice trebuie să se facă astfel încât să păstreze cadrul de citire al tripletelor. Dacă legarea introduce sau pierde 1 sau 2 nucleotide (sau alt număr nedivizibil cu 3), secvenţa în aval nu va putea fi citită. Aceasta este o rearanjare neproductivă.

Rearanjările apar iniţial la nivelul genei pentru lanţul H, care apare primul în citoplasma limfocitelor. Ulterior are loc rearanjarea segmentelor genice ale catenei L.

Limfocitele care nu generează o rearanjare genică productivă sunt eliminate, nefiind utile sistemului imunitar. Probabil că pentru o rearanjare productivă sunt necesare, statistic, multe altele neproductive, ceea ce presupune că pentru fiecare limfocit funcţional se pierde un număr mare de celule. Teleonomic însă, risipa este justificată de importanţa esenţială a funcţiei imunitare pentru organism.

Mecanismele de variabilitate enumerate permit ca în contextul existenţei a mai puţin de 1000 de gene în linia germinală, organismul să producă o mare diversitate de anticorpi: câteva miliarde de specificităţi diferite, sau *repertoriul* imunoglobulinelor.

Rearanjarea genelor se desfăşoară continuu în limfocitele B din *măduva hematogenă a oaselor*. Aici se asamblează o genă unică a lanţului H şi o alta a lanţului L, din familiile segmentelor genice funcţionale VH, D, JH, şi respectiv VL, JL.

PRODUCEREA ANTICORPILOR MONOCLONALI PRIN TEHNOLOGIA HIBRIDOMULUI

Metoda clasică de obţinere a anticorpilor necesari studiilor clinice şi de diagnostic constă în stimularea repetată, prin injectarea antigenului, într-un organism cu reactivitate imunitară optimă. Când cantitatea de anticorpi specifici este maximă, animalul este sângerat şi se obţine *serul imun* (antiserul), care este folosit ca atare, ori este utilizat pentru purificarea anticorpilor. Această metodă are câteva dezavantaje:

– cantitatea şi calitatea anticorpilor faţă de un antigen variază de la un organism la altul şi chiar între sângerările succesive ale aceluiaşi animal;

– serul imun este un amestec foarte heterogen de molecule de anticorpi, chiar şi în cazul în care imunizarea se face cu un antigen înalt purificat;

– oricât de simplu ca structură moleculară, un antigen are mai mulţi epitopi care stimulează mai multe *clone de limfocite*, ce produc anticorpi cu specificităţi şi afinităţi diferite;

– antigenele înalt purificate conţin impurităţi care determină formarea anticorpilor specifici în cantităţi disproporţionat de mari;

– chiar după purificare (procedeu costisitor), antiserurile conţin anticorpi cu afinităţi diferite şi cu reactivitate încrucişată;

– obţinerea unor cantităţi mari de anticorpi cu aceiaşi specificitate de legare faţă de un epitop este practic imposibilă.

În concluzie, antiserurile sunt *amestecuri de anticorpi policlonali*, în cantităţi variabile de la un organism la altul.

Tehnologia modernă de obţinere a anticorpilor omogeni, denumită *hibridoma* (*hibrid* + *mieloma*) a fost propusă de Köhler şi Milstein (1975) şi se bazează pe următoarele principii metodologice:

1) Antigenul purificat se injectează animalelor de experienţă;

2) Când titrul anticorpilor specifici în sânge este maxim, din splină sau din ganglionii limfatici se separă limfocitele. Fiecare limfocit şi plasmocitele generate prin diviziuni succesive sintetizează molecule omogene de anticorpi, cu specificitate unică de combinare pentru un singur epitop, denumiţi *anticorpi monoclonali* (AMC);

3) Limfocitele B, ca oricare alte celule normale trăiesc puţin în afara organismului, iar plasmocitele, care sintetizează cea mai mare cantitate de anticorpi nu supravieţuiesc în culturi;

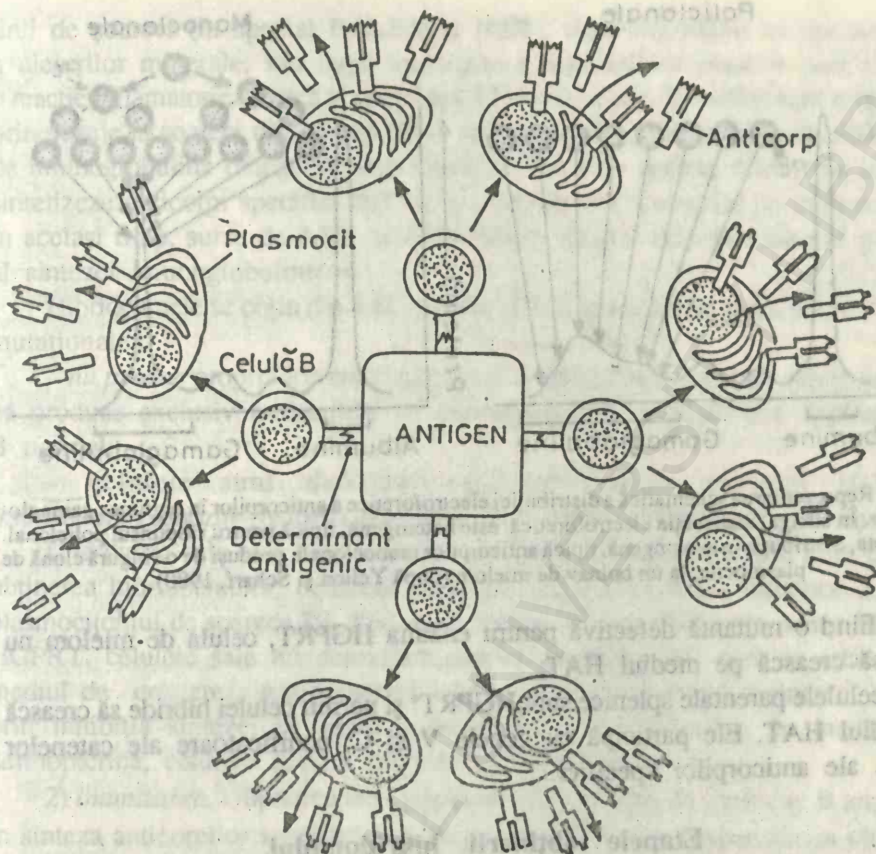


Fig. 19. Heterogenitatea specificităţii anticorpilor ce se sintetizează în răspunsul imun. O moleculă de antigen care poartă 4 epitopi diferiţi stimulează tot atâtea clone de limfocite B, care se diferenţiază în plasmocite şi produc 4 tipuri de anticorpi, fiecare având specificitate faţă de un epitop (după Kennedy şi colab., 1985).

4) Celulele de mielom sunt nemuritoare datorită capacităţii lor de a se menţine, practic, un timp nelimitat în culturi. Fuziunea lor cu limfocitele B *in vitro*, le conferă celor din urmă proprietatea de *nemurire*.

Obţinerea unor hibrizi dintre o celulă de mielom de şoarece şi o celulă normală producătoare de anticorpi, de la aceiaşi specie, pentru producerea continuă a AMC a introdus un nou concept – al *imortalizării funcţiilor specifice diferenţiate.*

Caracteristicile esenţiale ale hibridoamelor producătoare de anticorpi sunt următoarele:

– celula de mielom participă la fenotipul hibrid nemuritor, cu capacitatea sa de a creşte permanent în cultură;

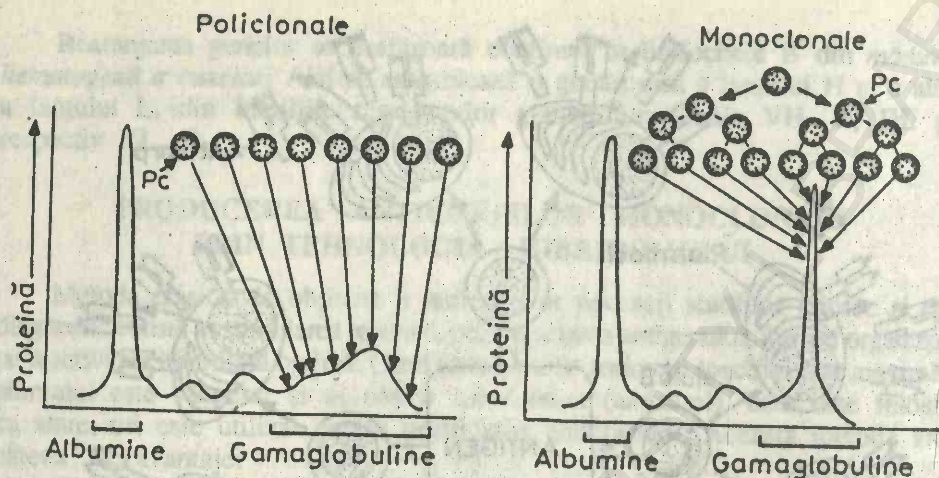


Fig. 20. Reprezentarea schematică a distribuţiei electroforetice a anticorpilor în regiunea gamaglobulinelor. În stânga, distribuţia electroforetică este heterogenă, tipică pentru răspunsul policlonal. În dreapta, distribuţia este omogenă, tipică anticorpilor monoclonali, produşi de o singură clonă de plasmocite, la un bolnav de mielom (după Yelton şi Scharf, 1980).

– fiind o mutantă defectivă pentru enzima HGPRT, celula de mielom nu poate să crească pe mediul HAT;

– celulele parentale splenice sunt $HGPRT^+$ şi permit celulei hibride să crească pe mediul HAT. Ele participă cu genele V şi C, codificatoare ale catenelor H şi L ale anticorpilor specifici.

Etapele obţinerii hibridomului

Metodologia obţinerii unei linii celulare hibride, nemuritoare, producătoare de anticorpi monoclonali (AMC) parcurge următoarele faze:

1) *Obţinerea celulelor de mielom.* Mielomul (plasmocitomul) este rezultatul diviziunilor necontrolate ale unui singur plasmoblast sau ale unui precursor al său din linia limfocitară B. Proliferarea necontrolată este însoţită de producerea unor cantităţi mari de molecule de imunoglobuline omogene, cu proprietăţi uniforme, deosebirea fiind legată de faptul că aceste molecule nu mai au specificitatea de legare a moleculelor produse de celula normală. În sânge se acumulează o cantitate mare de *proteine de mielom* (proteine M sau paraproteine). În laboratorul clinic, diagnosticul de mielom se pune după detectarea în ser, a unei cantităţi mari de molecule din clasa imunoglobulinelor, (circa 50 mg/ml), omogene la electroforeză.

Tumorile de mielom apar spontan la multe mamifere, iar la om, 1% din tumori sunt mieloame. Experimental, tumorile de mielom se induc la mai multe

linii de şoareci (în special BALB/c şi NZB), după injectarea intraperitoneală a uleiurilor minerale, sau după implantarea materialelor plastice care produc o reacţie inflamatorie cronică şi apar după 120–130 de zile. Tumorile sunt menţinute prin pasaje la şoareci din aceiaşi linie, sau *in vitro* şi produc cantităţi suficiente de imunoglobulină omogenă pentru analiză. Nu s-au obţinut mieloame care să sintetizeze anticorpi specifici faţă de un antigen dat. Tumorile de mielom sunt în acelaşi timp, surse de ARN şi ADN pentru studiul determinismului genetic al sintezei imunoglobulinelor.

Hibridoamele se obţin din linii speciale de mielom, care au două particularităţi mutaţionale:

– *nu produc* propria lor moleculă de imunoglobulină, astfel că celula hibridă va produce exclusiv moleculele de imunoglobulină caracteristice limfocitului B normal;

– celulele sunt *deficiente* pentru sinteza enzimei HGPRT (*h*ipoxantin–*g*uanozin–*f*osforibozil–*t*ransferază) necesară sintezei acizilor nucleici.

Una dintre cele mai cunoscute linii celulare de mielom, foarte utilă pentru obţinerea hibridoamelor, deoarece prezintă cele două defecte mutaţionale este plasmocitomul de şoarece P3–X63–Ag8. Deoarece sunt deficiente pentru sinteza HGPRT, celulele sale nu detoxifică efectul aminopterinei care se adaugă în mediul de creştere. Aminopterina blochează calea normală a sintezei ADN, prin inhibiţia sintezei de novo a purinelor şi pirimidinelor. În mediul cu aminopterină, celulele acestui mielom nu supravieţuiesc.

2) *Imunizarea*. Obţinerea unei populaţii cât mai mari de limfocite B angajate în sinteza anticorpilor specifici faţă de un anumit epitop (expansiunea clonală) se realizează prin imunizare. Diviziunile repetate produc creşterea numărului de limfocite B ale clonelor stimulate.

3) *Fuziunea* se realizează în scopul „imortalizării" celulelor producătoare de anticorpi. Imortalizarea este capacitatea celulelor de a creşte indefinit *in vitro*, fără senescenţă, ca o consecinţă a transformării indusă prin fuziune cu alte celule deja transformate (cu ajutorul substanţelor chimice sau al virusurilor oncogene).

Cele mai folosite pentru fuziune sunt limfocitele B din splina de şoarece din linia BALB/c (din aceiaşi linie provin şi celulele de mielom), pentru a evita manifestările fenomenelor de incompatibilitate, ulterior când celulele de hibridoma sunt cultivate ca tumori pe aceiaşi linie BALB/c. Proporţia limfocitelor producătoare de anticorpi în splină, este mică: $1/10^3$–$1/10^5$.

Fuziunea limfocitelor viabile din splină (obţinute prin dezagregare mecanică) cu celulele de mielom HGPRT$^-$ se realizează prin amestecul lor în proporţie de circa 5 celule splenice/ o celulă de mielom. Procesul fuziunii este stimulat

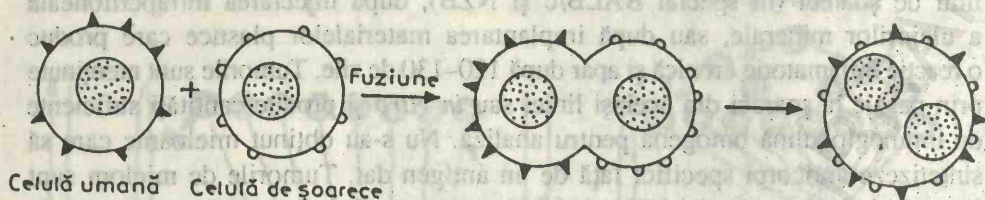


Fig. 21. Fuziunea celulelor umane şi murine produce un heterocarion binucleat, pe suprafaţa căruia cele două tipuri de antigen rămân localizate pe zona de membrană corespunzătoare. După 40 min., la 37°C, antigenele migrează în planul membranei fluide şi se amestecă pe suprafaţa celulei hibride (după Raff, 1976).

pe mai multe căi, dar cel mai adesea se foloseşte PEG cu greutatea moleculară până la 4000 D. Amestecul de celule se menţine 3–8 min în 0,2–0,5 ml PEG 40%, la 37°, pH = 7,5–8.

4) *Selecţia celulelor de hibridom*. Amestecul de fuziune conţine celule splenice şi de mielom nefuzionate, celule splenice fuzionate între ele, celule de mielom fuzionate între ele şi celule *hibridom* (fuzionate splenice x mielom). Selecţia are ca scop, separarea celulelor de hibridom şi eliminarea celorlalte tipuri (nefuzionate sau hibride neutilizabile). În acest scop, amestecul de celule se cultivă pe *mediul selectiv* HAT (*h*ipoxantină, *a*minopterină, *t*imidină) în care splenocitele normale (nefuzionate) şi fuzionaţii splenici x splenocit mor în 1–2 săptămâni, copleşite fiind numeric de celulele de hibridom, care se divid la fiecare 17–24 ore. Mediul selectiv HAT permite, numai supravieţuirea produselor de fuziune *mielom x splenocit* şi este inhibitor pentru celulele de mielom, ca şi pentru fuzionaţii mielom x mielom. Acţiunea sa selectivă se bazează pe următoarele condiţii experimentale:

a) Aminopterina (analog al acidului folic) prezentă în mediul HAT blochează sinteza purinelor şi pirimidinelor şi pe această cale, sinteza acizilor nucleici. În acest mediu, celulele devin dependente de surse externe de purine şi timidină. Hipoxantina din mediul HAT poate fi convertită la inozin-monofosfat, (din care derivă adenozin-monofosfat şi guanozin-monofosfat) de către enzima HGPRT. Timidina poate fi fosforilată la timidin-monofosfat şi timidin-trifosfat, de către enzima timidin-kinază (TK). Ambele enzime (HGPRT şi TK) se găsesc în splenocitele normale.

b) Celulele de mielom sunt $HGPRT^-$ şi pe mediul selectiv HAT nu supravieţuiesc nici celulele ca atare şi nici fuzionaţii mielom x mielom. Pe acest mediu supravieţuiesc şi se divid indefinit *celulele de hibridom*, deoarece sunt $HGPRT^+$ (codificată de genomul splenocitelor) şi sunt „nemuritoare", calitate conferită de celulele de mielom.

5) *Clonarea*. Clona este o populaţie de celule identice, genetic stabile, derivate din diviziunea unei singure celule. Clonarea se face prin diseminarea suspensiei celulare diluate pe medii nutritive agarizate. Fiecare celulă de hibridom

produce prin diviziune, o colonie (*clonă*). Operaţia de clonare se repetă pentru a garanta o descendenţă omogenă. Dintre sutele de hibridoame clonate este necesară alegerea celor cu capacitate de sinteză a anticorpilor specifici faţă de antigenul cu care s-a făcut imunizarea. Hibridoamele producătoare de anticorpi cu specificitatea dorită se cultivă *in vitro*, în culturi cu perfuzie continuă cu mediu proaspăt, sau în bioreactoare cu capacitate mare. Cea mai simplă tehnică de cultivare este *in vivo* şi constă în inocularea intraperitoneală a circa 2 x 10^6 celule hibridoma, la organisme ale aceleiaşi linii genetice (pentru evitarea fenomenelor de incompatibilitate). Tumora se dezvoltă intraabdominal şi lichidul de ascită care o însoţeşte conţine anticorpi în proporţie de 50% din totalul proteinelor sale. Randamentul producţiei de anticorpi monoclonali *in vivo* este de 100–1000 ori mai mare decât *in vitro*. Anticorpii din lichidul ascitic se purifică prin fracţionare cu sulfat de amoniu sau prin metoda cromatografiei cu schimb de ioni.

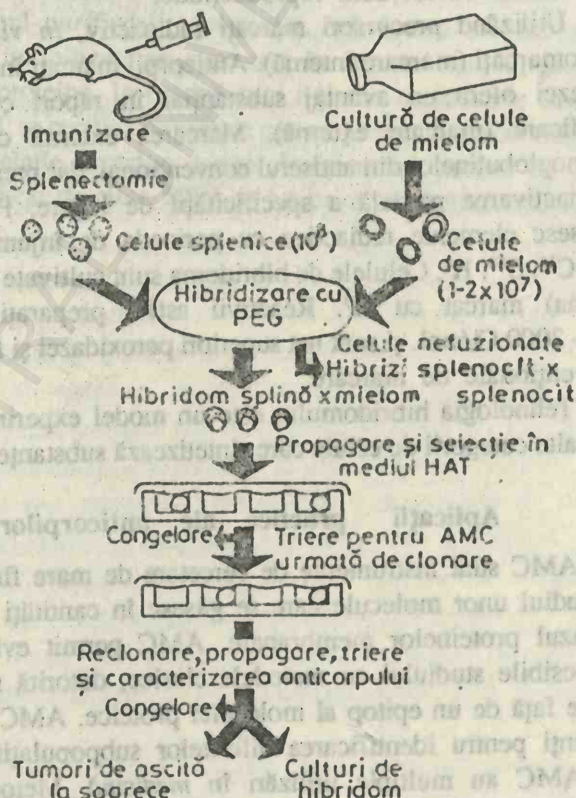


Fig. 22. Ilustrarea schematică a etapelor obţinerii hibridomului (după Corbitt şi Storey, 1983).

Avantajele biotehnologiei hibridomului

Producerea AMC are un avantaj foarte mare faţă de metoda convenţională a serului imun, care, datorită heterogenităţii antigenelor conţine anticorpi cu specificităţi multiple. Fiecare specificitate de anticorpi a unui amestec heterogen natural poate fi produs de câte un hibridom, deoarece celulele de hibridoma se clonează individual şi fiecare clonă celulară rezultată secretă anticorpi cu specificitate unică faţă de un singur epitop al unui antigen.

Celulele de hibridoma proliferează rapid, ceea ce scurtează timpul necesar obţinerii AMC.

Hibridoamele produc cantităţi mari de anticorpi, care depăşesc de câteva ori concentraţia anticorpilor din serul animalelor imunizate.

Clonele celulare individuale se menţin indefinit prin cultivare *in vitro* sau *in vivo*.

AMC reprezintă un reactiv imunochimic bine defint şi rezultatele obţinute prin utilizarea lor sunt reproductibile.

Utilizând precursori marcaţi radioactiv, *in vitro*, celulele produc AMC radiomarcaţi (marcare internă). Anticorpii marcaţi în interiorul celulei, în timpul sintezei oferă un avantaj substanţial în raport cu anticorpii marcaţi după purificare (marcare externă). Marcarea externă cu I^{125} implică purificarea imunoglobulinelor din antiserul convenţional, dar presupune modificarea chimică şi inactivarea parţială a specificităţii de legare. Pentru marcarea internă se folosesc elemente radiactive cu perioada de înjumătăţire mai lungă decât a I^{125}: C^{14}, S^{35}, H^{3}. Celulele de hibridoma sunt cultivate în prezenţa unui aminoacid (lizina) marcat cu H^{3}. Reactivii astfel preparaţi au o radioactivitate de 300–2000 Ci/mol. şi sunt net superiori peroxidazei şi feritinei utilizate în tehnicile convenţionale de marcare.

Tehnologia hibridomului este un model experimental care poate fi extins şi la alte categorii de celule care sintetizează substanţe utile (interferon, insulină).

Aplicaţii practice ale anticorpilor monoclonali

AMC sunt instrumente de cercetare de mare fineţe şi precizie, în special în studiul unor molecule care se găsesc în cantităţi foarte mici. De exemplu, în cazul proteinelor membranare, AMC permit evidenţierea lor în structuri inaccesibile studiului cu metodele clasice, datorită specificităţii lor stricte de legare faţă de un epitop al moleculei proteice. AMC s-au dovedit a fi markeri eficienţi pentru identificarea diferitelor subpopulaţii celulare.

AMC au multiple utilizări în *medicină*. Metoda clasică de obţinere a imunoserurilor a avut adeseori inconvenientul major al lipsei reproductibilităţii

rezultatelor. AMC sunt însă, tipuri moleculare definite şi se folosesc ca reactivi imunologici de mare specificitate în diagnosticul rabiei pe secţiunile de ţesut nervos al animalelor infectate, în diagnosticul hepatitei B, prin determinarea antigenului HBs în ser, al maladiilor venerice, al sarcinii, al infarctului miocardic, prin metoda radio-imuno-dozării.

AMC se folosesc în *farmacologie* în scop terapeutic şi profilactic:

– în scopul imunizării pasive sau al terapiei virozelor şi bacteriozelor;

– utilizarea AMC faţă de antigenele CMH ale grefei, ca imunosupresori, în cazul transplantului de organe;

– cuplarea AMC cu substanţe toxice (imunotoxine), în scopul orientării moleculelor toxice (toxina difterică, de ricin sau veninul de cobra) spre celulele bolnave din organism (în special AMC faţă de antigenele tumorale).

În *imunocitochimie*, AMC se folosesc pentru identificarea moleculelor neurotransmiţătoare, a receptorilor lor, a enzimelor de biosinteză. S-au obţinut AMC faţă de receptorul de acetilcolină, dar dificultăţile sunt mari deoarece neurotransmiţătorii sunt antigene slabe.

AMC se folosesc în scopul *purificării proteinelor*, sub forma coloanelor imunoabsorbante. AMC sunt imobilizaţi pe suporturi în coloane solide, prin care este trecut amestecul de proteine. În colonă sunt reţinute moleculele care se leagă specific de AMC. Astfel se purifică proteinele care se găsesc în concentraţii mici (interferonul), dar şi celelalte proteine serice. Interferonul produs de o tumoră de hibridoma este purificat de circa 5000 de ori printr-o singură trecere pe coloană.

Capitolul III

ANTIGENELE COMPLEXULUI MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE (CMH)

Existenţa antigenelor de histocompatibilitate a fost dedusă din faptul că grefele de piele sau de organe nu sunt viabile în organismul receptor. După 7–10 zile, ţesutul transplantat se inflamează şi curând grefa este respinsă. Respingerea este de natură imună: sistemul imunitar al receptorului de grefă recunoaşte ca nonself, anumite molecule ale suprafeţei celulelor grefei şi se activează. Moleculele recunoscute ca nonself sunt *denumite antigene de histocompatibilitate.* Ele conferă individualitate biochimică ţesuturilor fiecărui individ.

Antigenele de histocompatibilitate se definesc ca molecule ale suprafeţei celulare şi care, datorită diferenţelor biochimice individuale sunt recunoscute de sistemul imunitar al receptorului de grefă. Diversitatea biochimică de nivel individual a acestor molecule stă la baza unicităţii biochimice a fiecărui individ uman şi este determinată de o diversitate genetică corespunzătoare.

Antigenele CMH se numesc şi antigene de *transplantare*, deoarece se comportă ca antigene majore în organismul receptor de grefă.

Antigenele CMH diferă în privinţa capacităţii lor de a stimula răspunsul imun de respingere a grefei: sunt antigene *tari* şi *slabe.*

Antigenele *tari* reprezintă principala barieră în calea transplantului de ţesuturi şi organe. La şoarece, ele aparţin sistemului H-2. Grefele de ţesuturi şi organe între organisme care diferă prin antigenele H-2 pe celulele lor sunt invariabil respinse în 10–14 zile. Antigenele *slabe* (uşoare) sunt codificate de sistemul *minor de histocompatibilitate* şi determină respingerea lentă a grefei de piele, în circa 200 de zile.

La om, corespondentul sistemului antigenic H-2 de la şoarece este complexul antigenic al sistemului *HLA* (*h*uman *l*eucocyte *a*ntigen). Denumirea derivă din

faptul că moleculele sistemului HLA au fost detectate inițial (J. Dausset, 1954) pe suprafața leucocitelor.

Antigenele complexelor H-2 și HLA au multe variante genetice. De aceea, natura lor se poate studia numai în populații genetic pure (inbred) de șoareci, obținute prin împerecheri multiple, succesive, frate-soră.

Antigenele de transplantare se identifică și se clasifică după capacitatea lor de a se lega specific cu anticorpii care se sintetizează după ce o suspensie celulară a unui organism donor este injectată la un organism receptor din aceiași specie, dar genetic diferit. Unele dintre moleculele celulelor injectate sunt identice cu acelea ale receptorului, altele sunt diferite. Organismul receptor produce anticorpi față de moleculele diferite. Anticorpii formați definesc specificitățile antigenice ale celulelor injectate. Fiecare organism are o specificitate antigenică unică.

Specificitatea antigenică a unui organism dat poate reflecta prezența unei molecule antigenice pe celulele sale (ca donor de grefă), care nu există pe celulele receptorului sau poate reflecta diferențe structurale fine de histocompatibilitate antigenică ale unei molecule, prezentă atât la donor cât și la receptor, în variante genetice diferite.

Antigenele de histocompatibilitate sunt codificate de mai multe gene, care alcătuiesc împreună, *complexul major de histocompatibilitate (CMH)*.

Calificativul „*complex*" este justificat de numărul mare de gene componente, iar cel de „*major*" semnifică importanța deosebită a moleculelor codificate de aceste gene în realizarea unor funcții imunitare importante:

– respingerea rapidă a grefelor de țesuturi și organe;

– reacția limfocitară mixtă (RLM);

– reacția grefă contra gazdă.

Genele CMH participă la elaborarea răspunsului imun normal. În raport cu tipul de proteine pe care le codifică, genele aparțin clasei I-a și a II-a.

Genele CMH la șoarece care codifică complexul antigenic H-2 sunt localizate pe cromosomul 17, într-un fragment de 2000–4000 kb perechi, suficient de mare pentru a codifica circa 200 proteine de dimensiuni medii. În acest complex cartează 4 tipuri de gene descoperite independent:

– primul grup de gene (descoperit în anii ´40) codifică *antigenele tari* de transplantare, care induc respingerea rapidă a grefelor de piele și organe între indivizii neidentici genetic. Acestea sunt genele CMH clasa I, care codifică moleculele antigenice clasa I;

– al II-lea grup, denumite *genele răspunsului imun* (IR) codifică sinteza unor molecule care *condiționează intensitatea* răspunsului imun al

organismului, slab sau puternic, față de un antigen. Genele IR codifică proteinele clasei a II-a ale CMH, denumite încă și molecule *Ia* (I associated).

Moleculele CMH clasa I și a II-a au rol esențial în procesele de *recunoaștere specifică a antigenului.* Pentru a induce un răspuns imun, antigenul trebuie să interacționeze cu proteinele CMH clasa I sau a II-a. Cele care nu interacționează cu aceste molecule nu induc un răspuns imun.

– al III-lea set de gene care cartează la locusul CMH codifică sinteza unor componente ale sistemului complement;

– al IV-lea grup sunt genele *Tla* (*T*hymus *l*eukemia *a*ntigen). Ele codifică proteine antigenice de suprafață ale limfocitelor. Aceste molecule sunt similare ca structură, cu moleculele CMH clasa I și de aceea genele *Tla* sunt atribuite clasei I.

Moleculele CMH clasa I sunt codificate de gene situate la extremitățile complexului genic H-2, notate *K* și *D*. Cele două gene prezintă numeroase variante alele (peste 100). Fiecare variantă codifică proteine distincte.

La om, genele CMH codifică antigenele HLA și sunt localizate pe cromosomul 6. Anticorpii anti-HLA se obțin mai greu prin injectarea suspensiei celulare umane la animale, dar se găsesc în serul femeilor multipare, ca rezultat al stimulărilor antigenice HLA paterne, exprimate pe celulele fătului, absente pe celulele organismului matern. Acești anticorpi aparțin clasei IgG și se formează prin stimularea antigenică produsă de leucocitele fătului, care străbat bariera placentară și trec în circulația maternă. Anticorpii persistă în circulație perioade lungi de timp.

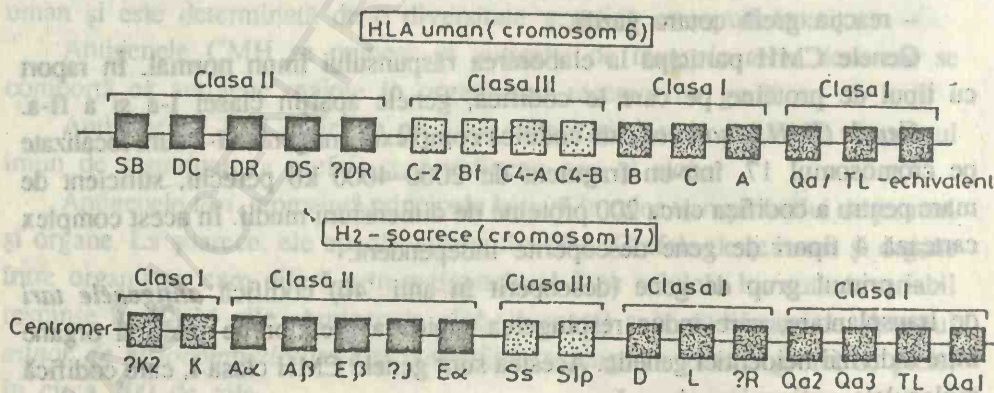


Fig. 23. Reprezentarea schematică a complexului major de histocompatibilitate HLA-uman și H-2 la șoarece, cu indicarea topografiei genelor din clasele I, II, III.

O altă sursă de ser imun anti-HLA sunt pacienţii politransfuzaţi, expuşi astfel antigenelor HLA de pe suprafaţa leucocitelor donorilor de sânge. Antiserurile HLA se pot prepara prin imunizarea voluntarilor.

Antigenele HLA la om, sunt codificate de 3 gene ale CMH: HLA-A, HLA-B, HLA-C. Ele sunt omologe genelor H-2D şi H-2K de la şoarece, aparţinând clasei I.

Gena HLA-D (comparabilă cu regiunea I de la şoarece) aparţine clasei a II-a.

C4, C2, Bf sunt genele clasei a III-a a CMH.

Sructura moleculară a antigenelor CMH clasa I

Antigenele codificate de genele CMH clasa I sunt glicoproteine de membrană, a căror regiune C-terminală se găseşte în citoplasmă, iar cea N-terminală este expusă extracelular.

O moleculă CMH clasa I este alcătuită dint-un lanţ H(*h*eavy) polipeptidic (45 kD) glicozilat, în asociaţie strânsă necovalentă cu β_2-microglobulina (12 kD), un polipeptid care se găseşte şi în ser. Catena H, alcătuită din 339 aminoacizi prezintă următoarele 5 domenii (regiuni); distibuite astfel:

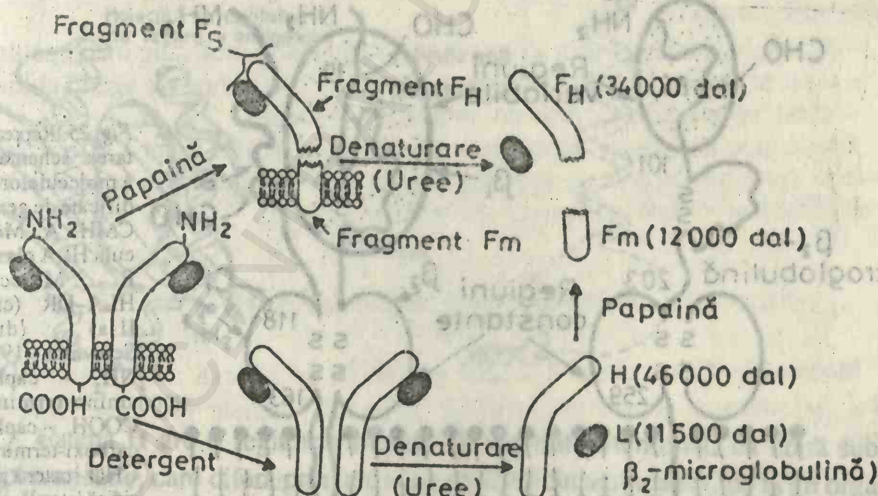


Fig. 24. Structura moleculelor CMH clasa I (K, D la şoarece sau HLA–A, B, C la om), determinată prin solubilizare cu detergenţi, clivare enzimatică cu papaină şi denaturare cu uree (după Gotze şi Burger, 1986).

– 3 domenii *extracelulare* în regiunea N-terminală, notate cu α_1, α_2, α_3, fiecare cu câte 90 aminoacizi. Sub acţiunea papainei pot fi scindate de restul moleculei. Domeniile α_2 şi α_3 prezintă legături S–S intracatenare şi formează bucle de 63 şi respectiv 86 aminoacizi;

– domeniul *transmembranar* conţine 25 de resturi de aminoacizi hidrofobi, care traversează membrana. Imediat deasupra acestei zone se găsesc 5 aminoacizi bazici (arg, leu), tipici pentru proteinele legate de membrană, cu rolul de a ancora lanţul polipeptidic în membrană;

– domeniul *hidrofil* citoplasmatic (30 aminoacizi la om, 40 la şoarece) conţine în special serină, unele resturi fiind fosforilate. Grupările fosforice sunt implicate în transmiterea semnalului de la domeniile extracelulare, la mediatorii citoplasmatici. Acest domeniu conţine resturi de cisteină, implicate în legarea (prin punţi S–S), de alte catene H sau de proteine citoplasmatice.

Componenta glucidică este alcătuită din două grupări, fiecare fiind formată din 12–15 resturi de zahăr, ataşate la α_1 şi α_2. Sunt oligozaharide care conţin manoză, de care se leagă lanţuri laterale de glucozamină şi acid sialic.

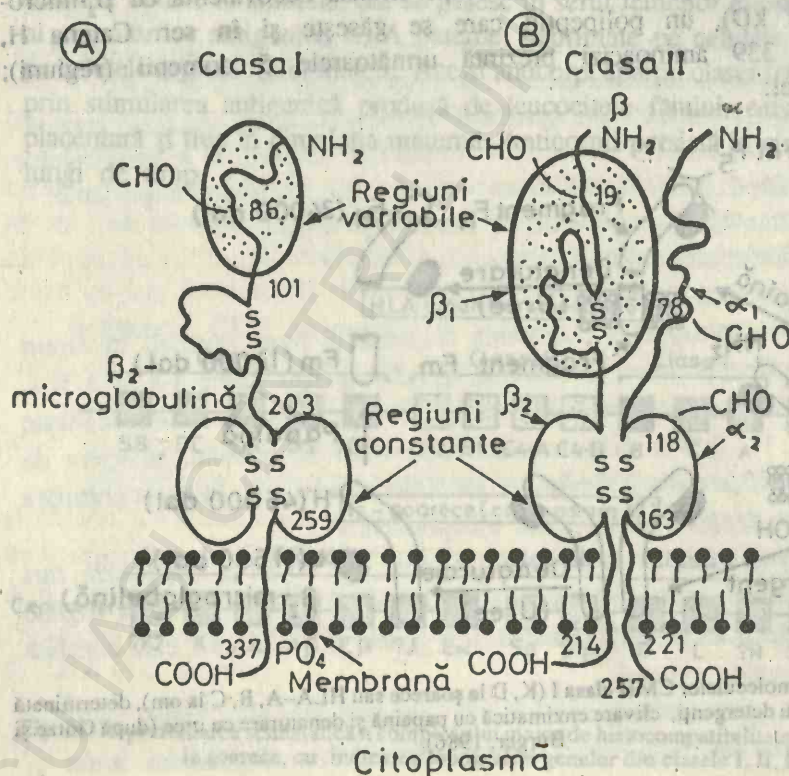


Fig. 25. Reprezentarea schematică a moleculelor codificate de genele CMH. A. Molecula HLA clasă I. B. Moleculă HLA-DR (clasa II-a) (după Schwartz, 1984) NH_2 – capătul amino-terminal: COOH – capătul carboxi-terminal; CHO – catenă glucidică laterală, PO_4 – fosfat. Numerele indică poziţia resturilor de aminoacizi cu anumite semnificaţii funcţionale.

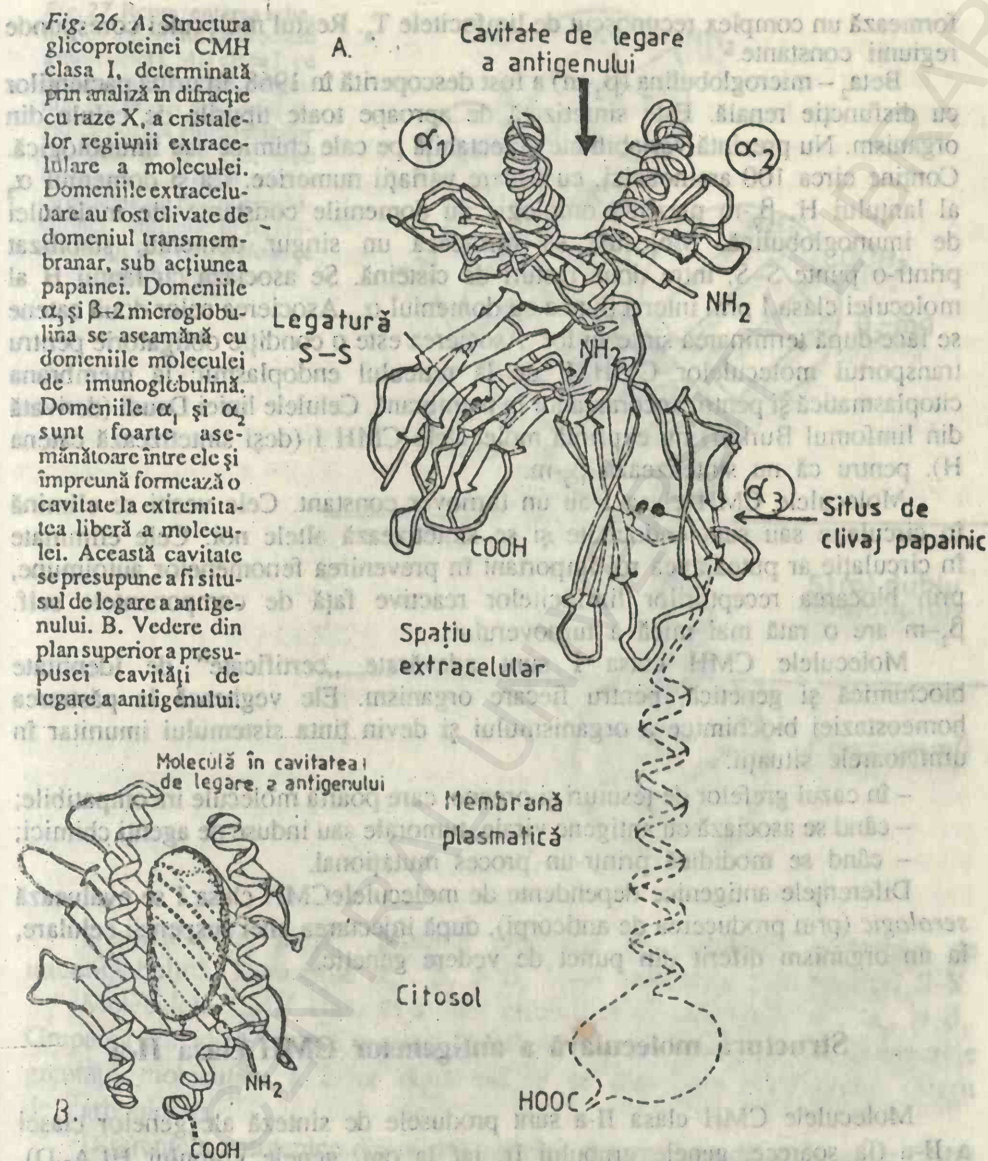


Fig. 26. A. Structura glicoproteinei CMH clasa I, determinată prin analiză în difracție cu raze X, a cristalelor regiunii extracelulare a moleculei. Domeniile extracelulare au fost clivate de domeniul transmembranar, sub acțiunea papainei. Domeniile α_3 și β-2 microglobulina se aseamănă cu domeniile moleculei de imunoglobulină. Domeniile α_1 și α_2 sunt foarte asemănătoare între ele și împreună formează o cavitate la extremitatea liberă a moleculei. Această cavitate se presupune a fi situsul de legare a antigenului. B. Vedere din plan superior a presupusei cavități de legare a anitigenului.

Catena H are o regiune variabilă la capătul N-terminal, cu două subzone hipervariabile, care diferă prin mai mult de 60% din aminoacizi, de la un organism la altul, localizate în domeniile α_1 și α_2. Studiile prin difracție cu raze X, ale domeniilor extracelulare, cristalizate după clivarea cu papaină arată că domeniile α_1 și α_2 sunt foarte asemănătoare și împreună formează o cavitate, presupusă a fi situsul de legare al antigenului. Acest situs, împreună cu antigenul

formează un complex recunoscut de limfocitele T_8. Restul moleculei corespunde regiunii constante.

Beta$_2$ – microglobulina (β_2-m) a fost descoperită în 1968, în urina pacienților cu disfuncție renală. Este sintetizată de aproape toate tipurile de celule din organism. Nu prezintă variabilitate detectabilă pe cale chimică sau imunologică. Conține circa 100 aminoacizi, cu ușoare variații numerice. Ca și domeniul α_3 al lanțului H, β_2-m prezintă omologie cu domeniile constante ale moleculei de imunoglobulină. Molecula sa formează un singur domeniu, stabilizat printr-o punte S–S, între două resturi de cisteină. Se asociază cu lanțul H al moleculei clasa I prin interacțiunea cu domeniul α_3. Asocierea celor două catene se face după terminarea sintezei lor. Asocierea este o condiție obligatorie pentru transportul moleculelor CMH I, de la reticulul endoplasmic la membrana citoplasmatică și pentru ancorarea lor în membrană. Celulele liniei Daudi (derivată din limfomul Burkitt) nu exprimă moleculele CMH I (deși sintetizează catena H), pentru că nu sintetizează β_2-m.

Moleculele CMH clasa I au un turnover constant. Cele vechi se elimină în circulație sau sunt endocitate și se sintetizează altele noi. Cele eliminate în circulație ar putea avea rol important în prevenirea fenomenelor autoimune, prin blocarea receptorilor limfocitelor reactive față de componentele self. β_2–m are o rată mai mică a turnoverului.

Moleculele CMH clasa I sunt adevărate „certificate“ de identitate biochimică și genetică, pentru fiecare organism. Ele veghează la păstrarea homeostaziei biochimice a organismului și devin ținta sistemului imunitar în următoarele situații:

– în cazul grefelor de țesuturi și organe, care poartă molecule incompatibile;
– când se asociază cu antigene virale, tumorale sau induse de agenți chimici;
– când se modidică printr-un proces mutațional.

Diferențele antigenice dependente de moleculeleCMH clasa I se evaluează *serologic* (prin producerea de anticorpi), după injectarea unei suspensii celulare, la un organism diferit din punct de vedere genetic.

Structura moleculară a antigenelor CMH clasa II-a

Moleculele CMH clasa II-a sunt produsele de sinteză ale genelor clasei a II-a (la șoarece, genele grupului Ir, iar la om, genele grupului HLA–D). Aceste gene codifică glicoproteine heterodimere de membrană, formate din două lanțuri diferite, notate α și β. Prin solubilizare cu detergent, aceste molecule se eliberează întregi. Lanțul α are 30–34 kD, iar lanțul β – 26–29 kD. Fiecare lanț este format din 4 domenii: două extracelulare, cu circa 90 aminoacizi) fiecare, notate α_1, α_2, respectiv β_1, β_2, un domeniu transmembranar (circa 30 aminoacizi) și un domeniu citoplasmatic (10–15 aminoacizi).

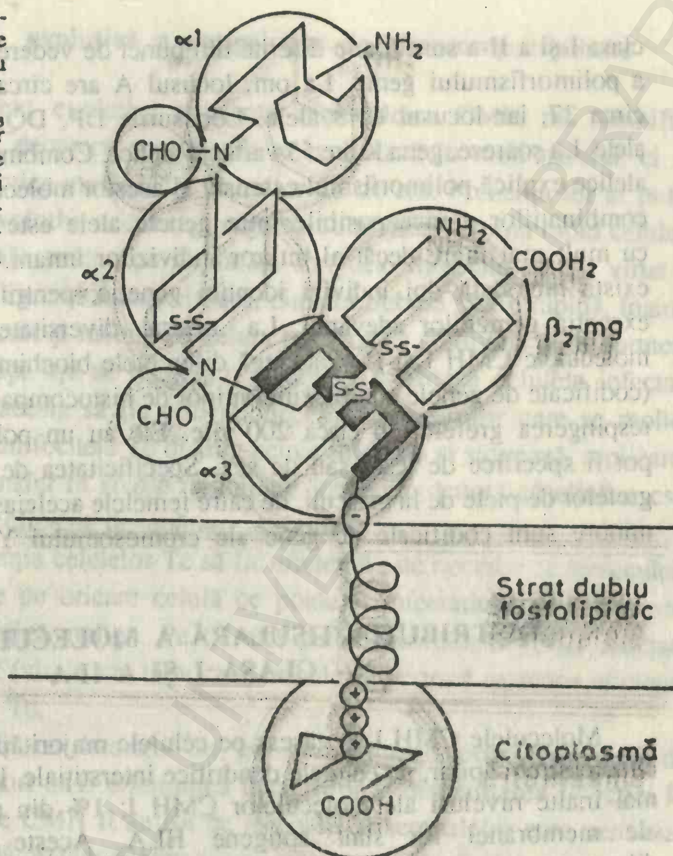


Fig. 27. Reprezentarea schematică a modului de asociere a moleculei CMH clasa I, cu β–2 microglobulina. Regiunile negre din domeniul α_3 indică poziţia aminoacizilor 199–222 şi 254–273, care înconjură cele două resturi de cisteină ale β–2 microglobulinei, implicate în formarea punţii S–S (după Hood şi colab., 1984).

Domeniile α_2 şi β_2 prezintă omologie cu domeniile moleculei de imunoglobulină. Domeniile α_2, β_1 şi β_2 sunt stabilizate prin legături S–S.

Moleculele CMH clasa II-a sunt glicozilate în domeniile α_1, α_2, şi β_1. Gruparea glucidică conţine manoză, galactoză, fucoză, glucozamină. Diferenţele greutăţii moleculare a celor două catene se datorează conţinutului diferit de carbohidraţi.

Diferenţele antigenice dintre doi indivizi, determinate de moleculele CMH clasa II-a se evaluează prin capacitatea lor de a iniţia *r*eacţia *l*imfocitară *m*ixtă (RLM). Limfocitele de la indivizi ce poartă alele diferite la locusul HLA–D sunt cocultivate *in vitro*. Condiţia reacţiei limfocitare *in vitro* este diferenţa unei singure alele la locusul HLA–D. Indivizii care au molecule CMH clasa I identice, nu reacţionează serologic, dar dacă celulele lor diferă prin alele ale locusului HLA–D, produc în răspuns intens în RLM. Moleculele CMH

clasa I şi a II-a sunt foarte diferite din punct de vedere biochimic, ca o expresie a polimorfismului genic. La om, locusul A are circa 15 alele, locusul B are circa 37, iar locusul C, 8 alele. Locusurile DP, DQ, DR au fiecare circa 12 alele. La şoarece, gena K are 55 variante alelice. Combinarea aleatorie a variantelor alelice explică polimorfismul extensiv al acestor molecule de suprafaţă. Numărul combinaţiilor genice posibile între genele alele este apreciat la 10^{90}, număr, cu mult mai mare decât al tuturor indivizilor umani. Nu au existat şi nu vor exista niciodată doi indivizi identici genetic, pentru toate alelele CMH, cu excepţia gemenilor adevăraţi. La uriaşa diversitate antigenică conferită de moleculele CMH I şi II se adaugă diferenţele biochimice ale antigenelor slabe (codificate de genele complexului minor de histocompatibilitate), care determină respingerea grefelor în circa 200 zile. Ele au un polimorfism mai limitat şi pot fi specifice de ţesut sau de sex. Specificitatea de sex explică respingerea grefelor de piele de la masculi, de către femelele aceleiaşi linii inbred. Antigenele minore sunt codificate de gene ale cromosomului Y.

DISTRIBUŢIA TISULARĂ A MOLECULELOR CMH CLASA I ŞI A II-A

Moleculele CMH I se găsesc pe celulele majorităţii ţesuturilor, pe celulele endoteliului capilar, pe celulele dendritice interstiţiale. Leucocitele exprimă cele mai înalte niveluri ale moleculelor CMH I: 1% din moleculele de suprafaţă ale membranei lor sunt antigene HLA. Aceste molecule sunt foarte diluate pe cele mai multe glande endocrine (cu excepţia glandelor adrenale). Lipsesc pe eritrocite, pe celulele endoteliului cornean, pe componenta exocrină a pancreasului, pe celulele acinare ale glandelor parotide, pe neuronii SNC.

Moleculele CMH II sunt exprimate predominant pe limfocitele B şi pe toate celulele care prelucrează şi expun antigenul pe suprafaţa lor: celulele endoteliale ale capilarelor sanguine şi limfatice, celulele Kupffer, celulele dendritice, eozinofile, microglia din SNC, celulele reticuloendoteliale ale stromei timice. Capilarele creierului uman şi placenta nu exprimă moleculele CMH II, ambele fiind organe privilegiate imunologic.

Intensitatea exprimării moleculelor CMH II este variabilă, fiind controlată de diferiţi factori: interferonul γ, IL-2 şi alte produse de sinteză a celulelor T amplifică nivelul de exprimare a moleculelor CMH II, iar PGE_2, glucocorticoizii, alfafetoproteina, lipopolizaharidele bacteriilor Gram negative diminuă gradul exprimării acestor molecule. Limfocitele B şi celulele tumorale eliberează molecule CMH II.

Interpretarea evolutivă a antigenelor de histocompatibilitate

Privită în context evolutiv, existenţa moleculelor CMH nu semnifică respingerea grefelor, deoarece acestea nu se realizează în mod natural, ci au fost introduse în practica medicală a ultimilor 25 de ani. Prezenţa lor ar putea fi atribuită, în sens evolutiv, necesităţii organismului de a elimina rapid celulele care prezintă molecule străine pe suprafaţa lor: cele infectate de un virus şi cele transformate malign. În aceste situaţii, citoliza trebuie să fie rapidă, înainte ca virusul să fie eliberat şi înainte ca celula malignă să se dividă şi să formeze o microtumoră. În fapt aşa se întâmplă: celulele Tc lizează celulele infectate cu virus, înainte ca acesta să fie eliberat. În cazul virusurilor care se replică fără să lizeze celula, limfocitele Tc distrug celula infectată şi stopează replicarea virală. Probele de transfer *in vivo* a imunităţii dobândite denotă că citoliza este un mecanism foarte eficient de apărare antivirală.

Pentru ca intervenţia celulelor Tc să fie eficientă este necesar ca moleculele CMH să fie prezente pe oricare celulă ce poate fi infectată de un virus sau poate să fie transformată malign. Pe de altă parte, moleculele CMH asociate cu moleculele nonself (virale sau tumorale) trebuie să permită acţiunea eficientă şi rapidă a celulelor Tc.

Celulele infectate cu bacterii nu pot fi eliminate prin fenomene de citotoxicitate. Rezultatul ar fi eliminarea bacteriilor şi diseminarea infecţiei în alte celule. Moleculele CMH II au rol de receptori ai semnalelor care *activează* capacitatea funcţională a fagocitelor.

Capitolul IV

SISTEMUL IMUNITAR (SISTEMUL IMUNOCITAR, SAU LIMFOID)

Existenţa tuturor organismelor vii este condiţionată de activitatea unor mecanisme de *rezistenţă* şi de *imunitate*, capabile să protejeze individualitatea lor chimică prin recunoaşterea şi diferenţierea substanţelor proprii (self) de cele străine (nonself). În mod normal, aceste mecanisme sunt perfect tolerante faţă de moleculele self, dar se activează şi reacţionează mai mult sau mai puţin viguros pentru a îndepărta, a neutraliza sau a distruge substanţele şi celulele nonself.

Mecanismele de rezistenţă şi imunitate sunt prezente pe toată scara evolutivă a organismelor, începând cu bacteriile şi se complexează gradat în evoluţie.

Celulele bacteriene posedă mecanisme de protecţie a individualităţii genetice, reprezentate de:

– fenomenele de *restricţie* mediate de prezenţa unor sisteme enzimatice specifice (enzime de restricţie) care recunosc moleculele străine de ADN, le secţionează la nivelul unor situsuri specifice, rezultând fragmente mai mici sensibile la acţiunea exo- şi endonucleazelor;

– fenomenele de *reparaţie* genetică dependente de activitatea unor sisteme enzimatice care recunosc modificările ADN induse de mutaţii sau de lipsa de fidelitate a mecanismelor de replicare, transcriere şi traducere genetică, corectându-le fie complet (sistemele error free) sau minimalizând erorile în cazul sistemelor reparatorii predispuse la erori (error prone systems).

La plantele superioare, mijloacele de recunoaştere specifică lipsesc în aparenţă, dar există o gamă largă de modalităţi de apărare:

– continuitatea şi integritatea ţesuturilor epidermice, acoperite sau impregnate cu substanţe impermeabile pentru virusuri şi microorganisme;

– rezistenţa fiziologică conferită de conţinutul înalt de zaharuri reducătoare, prezenţa taninurilor, a diferiţilor acizi organici, a pseudoanticorpilor în sucurile vegetale cu activitate hemaglutinantă;

La protozoare, procesele de recunoaştere asigură selecţia hranei, identificarea partenerilor pentru conjugare, iar la organismele parazite, procesele de recunoaştere mediază recunoaşterea gazdei.

La organismele superioare, coexistenţa, în cursul evoluţiei, cu microorganismele a determinat apariţia unor mecanisme complicate de rezistenţă şi imunitate. Coexistenţa cu microorganismele are un rol hotărâtor în funcţionalitatea sistemului imunitar. Dovada o constituie faptul că la animalele axenice (germ free) numărul limfocitelor B şi titrul anticorpilor serici naturali sunt de 5–10 ori mai mici decât la organismele convenţionale. Evoluţia a generat tipuri celulare specializate, tot mai eficiente funcţional care neutralizează, sechestrează, omoară sau îndepărtează agenţii infecţioşi. Dincolo de un anumit grad de complexitate, reacţiile de apărare implică participarea unor *factori humorali* (anticorpi şi factori nespecifici-complementul, substanţe bactericide – din umori) şi *celulari* (fagocite şi imunocite).

Din punct de vedere structural, în concepţia modernă, sistemul imunitar al organismelor superioare este considerat ca un *organ difuz* sui-generis, alcătuit dintr-un număr foarte mare de molecule şi celule, reunite într-o reţea de interacţiuni complexe, al căror efect este asigurarea integrităţii şi individualităţii structurale a organismului.

În concepţia restrictivă a lui Jerne, sistemul imunitar ar fi reprezentat în exclusivitate de *limfocite*, iar într-o accepţiune mai largă, pe lângă limfocite, în alcătuirea sistemului imunitar intră o serie de celule accesorii care au un rol esenţial în declanşarea răspunsului imun: macrofagele şi o serie de celule înrudite (celulele Langerhans din piele, celulele dendritice, interdigitate).

Jerne apreciază numărul limfocitelor, la adultul normal la circa 2×10^{12}, iar al moleculelor de imunoglobuline, la 10^{20}. Împreună, aceste componente formează *organul imunitar difuz* cu o greutate de circa 910 g, a cărui existenţă este adesea ignorată datorită dispersării sale în tot organismul. Celulele şi moleculele sistemului imunitar sunt prezente în toate ţesuturile, dar în unele organe (splina, ganglionii limfatici, plăcile Peyer, amigdale, timus), componentele sale celulare sunt mai dense.

Din punct de vedere structural şi funcţional, sistemul de apărare al organismelor superioare prezintă numeroase dualităţi:

– existenţa unui compartiment al *rezistenţei nespecifice* şi *neadaptative* (înăscută) şi a unui compartiment cu *acţiune specifică şi adaptativă* (sistemul imunitar);

– prezenţa a două tipuri de limfocite (T şi B), care mediază imunitatea celulară şi respectiv humorală;

– activitatea limfocitelor este modulată fie *stimulator*, fie *inhibitor*, sub acţiunea unor celule şi a unor factori humorali;

– existenţa organelor *limfoide centrale* (primare) şi a celor *periferice* (secundare);

– existenţa unui *răspuns imun primar* şi a unui *răspuns imun secundar*;

– dualitatea structurală (două perechi de lanţuri polipeptidice) şi *funcţională* (molecula de anticorp este bivalentă) a moleculelor de imunoglobulină.

– *comportamentul dublu* al moleculelor de anticorpi: recunosc epitopii corespunzători şi la rândul lor sunt recunoscute de molecule receptor.

Sistemul imunitar este *esenţial* pentru supravieţuirea organismului uman şi animal, datorită agresiunii permanente a virusurilor şi microorganismelor. Omul adult poartă pe suprafaţa mucoaselor şi a pielii, un număr uriaş (10^{14}) de celule bacteriene, mai multe decât propriile celule (10^{13}).

Numărul celulelor sistemului imunitar (cu un ordin de mărime superior neuronilor) şi al moleculelor sale nu reflectă fidel potenţialul de apărare al organismului, deoarece în cursul răspunsului imun are loc *proliferarea* şi *amplificarea* populaţiei de limfocite, precum şi a potenţialului lor de biosinteză. La aceasta se adaugă o rată înaltă de *reânoire şi refacere* a rezervelor sale celulare. La om se produc zilnic 10 miliarde de limfocite care trec în circulaţie. Circulând şi recirculând prin reţeaua vaselor sanguine şi limfatice, celulele şi moleculele sistemului imunitar asigură supravegherea organismului, recunoaşterea moleculelor şi a celulelor străine pentru a le elimina.

LIMFOCITELE

Sistemul imunitar este unul dintre cele mai complexe sisteme ale organismului. Complexitatea sa derivă din *structura de reţea* complicată de comunicaţii intercelulare, din *ubicvitatea* sa în organism şi din *efectele* multiple pe care le determină un număr mic de categorii celulare.

Sistemul imunitar este reprezentat de ţesuturi derivate din mezoderm, a căror principală componentă celulară este *limfocitul*. De aici derivă denumirea de *ţesut limfoid*. În utimul timp se utilizează denumirea de „*limfon*", care semnifică totalitatea organelor limfoide – primare şi secundare precum şi celulele componente corespunzătoare, care au funcţia de a recunoaşte antigenul şi de a păstra memoria lui la nivel celular şi molecular.

Sistemul limfoid cuprinde celulele, care în cursul elaborării răspunsului imun reacţionează specific cu antigenul şi de aceea se mai numesc *imunocite*. O denumire echivalentă pentru *sistemul limfoid* este aceea de *sistem imunocitar*. Toate celulele acestui sistem poartă pe suprafaţa lor, molecule cu rol de *receptor*, capabile să recunoască specific, determinanţii antigenici străini. Sistemul imunitar funcţionează pe baza interacţiunii specifice dintre semnal (antigen) şi receptorul limfocitar.

În concepţia modernă, limfocitul este celula cheie a sistemului imunitar. Limfocitul nu este „celulă cap de serie" (aşa cum considerau vechii histologi), ci prezintă o extraordinară capacitate de reactivitate şi diferenţiere.

Numărul limfocitelor. Copiii au un număr mai mare de limfocite şi de aceea vârsta trebuie considerată ca un parametru de variaţie, în evaluarea numerică a acestor celule. Ele reprezintă 25–33% dintre leucocite, adică circa 2100 celule/ml sânge la adult.

Până în anii '50, limfocitele erau distinse numai după dimensiuni: mari, mijlocii şi mici. Astăzi, imunologia are la bază conceptul unei *heterogenităţi funcţionale nelimitate* a limfocitelor, care derivă din diversitatea receptorilor existenţi pe suprafaţa lor.

Populaţia de limfocite care are receptori identici şi recunoaşte un singur epitop (sau câţiva înrudiţi) formează o *clonă*. Ele sunt descendente ale unei singure celule-mamă. În consecinţă, în organism sunt tot atâtea clone de limfocite, câte tipuri de determinanţi antigenici există (teoretic) în natură. Corespondenţa dintre receptorii limfocitari şi epitopii antigenici asigură posibilitatea elaborării unui *răspuns imun specific*, după contactul limfocitelor cu oricare dintre epitopi.

Cele mai multe limfocite circulante au dimensiuni mici: 7–10 μm diametru.

Caracterizarea funcţională a limfocitelor este rezultatul cercetărilor întreprinse după 1960. În raport cu organul limfoid primar în care se produce diferenţierea şi maturarea, Roitt şi colab. (1966) au împărţit limfocitele în două categorii distincte:

– limfocite T, diferenţiate şi maturate în timus;

– limfocite B, diferenţiate şi maturate în bursa lui Fabricius la păsări şi în echivalenţii ei la mamifere.

În mod obişnuit, limfocitele T reprezintă 55–80 % dintre limfocitele circulante. Valorile normale în sânge, pentru limfocitele T sunt 1620 4320/ml, până la 18 luni de viaţă şi 590–3090/ml, după 18 luni.

Valori totale sub 1500 limfocite/ml caracterizează starea de *limfocitopenie* şi cel mai adesea semnifică un deficit numeric al limfocitelor T.

Proporţia limfocitelor T se poate determina prin metoda rozetelor cu hematii de berbec, sau prin metoda imunofluorescenţei cu anticorpi monoclonali faţă de receptorul de antigen.

În funcţie de capacitatea de a interacţiona cu antigenul specific, limfocitele sunt:

– *incompetente* (cele care nu interacţionează cu antigenul);

– *competente* (cele care recunosc şi interacţionează cu antigenul).

Starea de *competenţă* este condiţionată de prezenţa receptorilor prin care antigenele sunt recunoscute. Pe suprafaţa unui receptor pot fi până la 100.000 molecule receptoare identice care aşteaptă întâlnirea cu substanţele nonself corespunzătoare. După ce limfocitul şi-a dobândit competenţa în unul din organele limfoide primare, poate să rămână în repaus, fără contact cu antigenul, dacă organismul nu a recepţionat semnalul antigenic corespunzător. Aceste limfocite sunt *neangajate* (neinformate). Cele care au venit în contact cu antigenul sunt limfocite *angajate*. Ele constituie substratul material al *memoriei imune* şi ori de câte ori se vor reîntâlni cu antigenul, vor produce un răspuns imun amplificat şi rapid.

După durata vieţii, limfocitele sunt:

– cu *viaţă scurtă* (efectoare ale răspunsului imun);

– cu *viaţă lungă* (de memorie). Ele recirculă în organism perioade îndelungate (chiar tot restul vieţii). La om, unele limfocite ar supravieţui circa 10 ani fără să se dividă.

În raport cu funcţia pe care o îndeplinesc, limfocitele sunt:

– *efectoare*, cele care direct sau indirect, prin molecule efectoare neutralizează antigenul;

– *reglatoare*, cele care realizează echilibrul optim al răspunsului imun.

LIMFOCITELE T

Limfocitele T sunt celule care îndeplinesc funcţii complexe, atât *efectoare* ale *r*ăspunsului *i*mun *m*ediat *c*elular (RIMC), cât şi *reglatoare*, prin intermediul unor factori humorali denumiţi *limfokine*. Limfocitele T realizează următoarele categorii de funcţii:

– liza celulelor care exprimă molecule nonself pe suprafaţa lor;

– reglarea răspunsului imun;

– sunt mediatoare ale reacţiilor de hipersensibilitate întârziată.

Aceste funcţii sunt rezultatul activării unor subpopulaţii distincte de limfocite T:

– limfocite T_C sau T_{CL} (*c*itotoxice sau *c*ito*l*itice) care exprimă pe suprafaţa lor markerul T_8 (CD_8);

– limfocite T_H (T *h*elper, to help = a ajuta), care au pe suprafaţa lor markerul T_4 (CD_4);

– limfocite T_S (*s*upressor), purtătoare ale markerului T_8;

– limfocite T_D sau T_{DH} (*d*elayed *h*ypersensitivity) exprimă markerul T_8.

Limfocitele T_4 (T helper) reprezintă 65% din limfocitele T ale sângelui uman.

Prin intermediul limfokinelor pe care le secretă, limfocitele T helper realizează următoarele funcții:

– stimulează diferențierea limfocitelor B spre plasmocit (T_{HB});
– stimulează funcția litică limfocitelor Tc asupra celulelor țintă T_{HC});
– stimulează acțiunea litică a limfocitelor NK;
– stimulează activitatea macrofagelor.

Prin aceste efecte, limfocitele T helper sunt amplificatoare ale răspunsului imun.

Pe baza limfokinelor pe care le secretă *in vitro*, prin cultivare îndelungată, limfocitele T helper (T_4) pot fi împărțite în două seturi:

– Setul de limfocite T_H–2 secretă IL–3, IL–4 și IL–5. Efectul lor principal constă în stimularea producerii de IgA. Sub acțiunea IL-4, producția de IgM a unei celule B este comutată la IgE. Comutarea la sinteza altui izotip reflectă acțiunea specifică a inducției recombinării asupra secvențelor VDJ, la nivelul locusului codificator la lanțului H. Aceste limfocite favorizează proliferarea și maturarea mastocitelor (prin IL-3 și IL-4 și a eozinofilelor (prin IL-5). Aceasta sugerează că limfocitele T_H–2 ar avea în esență rolul de a stimula răspunsul imun față de paraziți;

– Setul de limfocite T_H–1 secretă IL–2 și interferon γ. Ele au rolul de a favoriza reacția inflamatorie asociată cu reacția de hipersensibilitate întârziată și de aceea se numesc și T_{inf}. Prin interferonul γ, limfocitele T_H–1 stimulează exprimarea, pe suprafața macrofagelor, a receptorilor pentru segmentul Fc al imunoglobulinelor, astfel încât este stimulată activitatea lor citolitică mediată de anticorpi (ADCC).

Limfocitele T_8 (CD_8) reprezintă 35% dintre limfocitele T circulante. Ele îndeplinesc următoarele funcții:

– au efect *litic* față de celulele infectate cu virusuri, malignizate sau străine, prin contact celular direct. Acestea sunt limfocite Tc;

– au rol esențial în *modularea* răspunsului imun mediat celular și humoral, menținând în limite fiziologice intensitatea reacțiilor imunitare. Ele sunt limfocite T_S;

– sunt implicate în manifestarea *reacțiilor de hipersensibilitate întârziată de tip tuberculinic*, prin intermediul limfokinelor pe care le secretă, cu efecte locale asupra macrofagelor și limfocitelor din focar. Acestea sunt limfocite T_D.

Limfocitele Tc umane sunt capabile să exercite efect letal asupra celulelor care exprimă antigene străine pe suprafața lor. Capacitatea citotoxică a limfocitelor Tc se testează, *in vitro*, prin eliberarea izotopului din celulele țintă, marcate cu Cr^{51}.

Limfocitele Tc omoară celulele ţintă alogene, care exprimă molecule CMH diferite şi au stârnit un interes deosebit, datorită rolului lor posibil în respingerea grefelor de ţesuturi şi organe.

Limfocitele Tc pot să inducă efecte letale asupra celulelor proprii, dacă acestea exprimă antigenul viral pe membrana citoplasmatică. Probabil, aceasta este funcţia lor esenţială, deoarece transplantarea de ţesuturi este artificială.

Limfocitele Tc exprimă markerul CD_8, cu excepţia celor reactive faţă de moleculele CMH II alogenice, care au markerul CD_4.

În condiţii naturale, limfocitele Tc sunt celule efectoare foarte importante în controlul infecţiilor virale. Acţiunea citotoxică a limfocitelor Tc este restrictivă în raport cu moleculele CMH clasa I.

Limfocitele *T supresoare* (Ts) au rolul de a diminua intensitatea răspunsului imun. Ele poartă pe suprafaţa lor markerul CD_8, ca şi limfocitele Tc. Se pare că îşi exercită rolul supresor asupra răspunsului imun, prin inhibarea activităţii limfocilelor T_H, dar au şi efect supresor direct asupra limfocitelor T şi B efectoare.

Limfocitele Ts au rol important în inducerea stării de toleranţă faţă de antigenele exogene, ca şi faţă de moleculele self. Deficienţa funcţională a acestor limfocite creează predispoziţii pentru maladiile autoimune.

Limfocitele Ts nu se pot distinge cu certitudine, prin markeri de suprafaţă, de limfocitele Tc. Probabil că reprezintă o populaţie distinctă funcţional de limfocitele Tc.

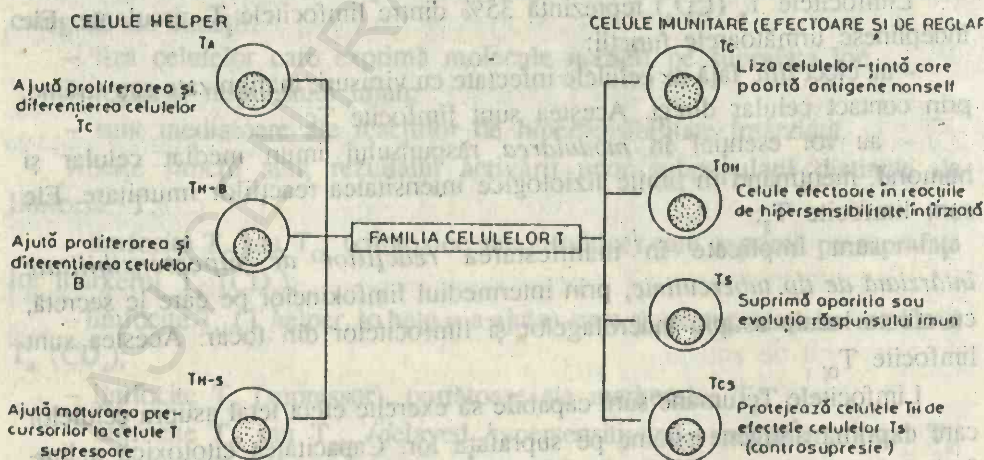


Fig. 28. Familia limfocitelor T (modificat, după Hood şi colab., 1987).

Markerii de suprafaţă ai celulelor T umane s-au identificat cu dificultate datorită naturii outbred a populaţiei. S-au caracterizat parţial markerii T1, T2, T3, T4, T5, T6, T8, T10, T11, T12 T25, T38 etc. AMC au constituit instrumentul esenţial de lucru, dar utilizarea lor este limitată deoarece heteroanticorpii de şoarece anti-molecule umane nu detectează diferenţele alelice ale moleculei-antigen studiate. Cel mai cunoscut este markerul T4 (CD4) deoarece funcţionează ca receptor pentru HIV. Este un glicopeptid cu o regiune extracelulară formată din 4 domenii, un domeniu transmembranar şi unul citoplasmatic.

Celulele T recunosc antigenul numai dacă acesta este prezentat pe suprafaţa unei celule în strânsă asociaţie cu moleculele proprii celulei respective:

– celulele T8⁺ recunosc antigenele în asociaţie cu moleculele CMH I;
– celulele T4⁺ recunosc antigenele în asociaţie cu moleculele CMH II.

Recunoaşterea antigenului este restrictivă, deoarece necesită identitatea moleculelor CMH pe celula care prezintă antigenul şi pe celula care îl recunoaşte.

LIMFOCITELE B

Limfocitele B reprezintă cea de a II-a diviziune funcţională majoră a populaţiei limfocitare. Împreună cu descendenţii lor diferenţiaţi (limfoblast, plasmocit), limfocitele B sintetizează anticorpi, efectorii răsounsului imun mediat humoral (RIMH).

Limfocitul B imunocompetent, în repaus, sintetizează cantităţi mici ale unui anumit tip de imunoglobuline, care rămân legate de membrana limfocitului ca molecule receptor, adevărate „antene" de detectare a antigenului specific. Sub aspectul specificităţii de legare a antigenului, în fiecare organism există milioane de *clone* de limfocite B, adică mici populaţii care recunosc şi leagă acelaşi antigen, descendente din aceiaşi celulă mamă, care produc anticorpi cu aceiaşi configuraţie spaţială a situsului de combinare. Markerii de suprafaţă ai limfocitelor B sunt CD_9, CD_{19}, CD_{20}, CD_{21}, CD_{22}, CD_{23}, CD_{24} etc.

Celulele NK, K şi LAK

Celulele NK (*n*atural *k*iller) formează o subpopulaţie de celule limfoide neaderente *in vitro* şi nefagocitare. *Nu au* receptorii de antigen caracteristici limfocitelor T şi B (sunt celule „nule"). Din punct de vedere morfologic sunt limfocite granulare mari (*l*arge *g*ranular *l*imphocytes = LGL), având citoplasmă mai bogată decât celelalte limfocite, cu granulaţii azurofile. Celulele NK au pe suprafaţa lor unii markeri caracteristici limfocitelor (receptor pentru Fcγ, formează rozete E) şi produc IL–2, dar şi receptori ai seriei mieloide. Celulele

Celulele NK nu sunt dependente de timus în dezvoltarea lor. Se pare că se diferenţiază dintr-un precursor *comun* cu al limfocitelor T. Ar putea fi celule *T pretimice*. Sunt celule cu viaţă scurtă şi reprezintă o linie importantă, primordială în evoluţie, cu rol esenţial în apărarea organismului: sunt active în respingerea grefelor şi a celulelor modificate sub raport antigenic. Acţiunea lor definitorie este *citotoxicitatea* pentru un spectru larg de celule ţintă, mai ales maligne. Celulele NK lizează fără restricţie CMH, celulele tumorale sau pe cele infectate cu virusuri. Au activitate foarte înaltă la şoarecele nud sau timectomizat neonatal.

Celulele K (killer) sunt limfocite granulare mari, dar exprimă foarte net receptorul pentru Fc. Celulele K ar fi celule NK, monocite, promonocite sau o linie separată derivată din măduva oaselor. Unii autori nu fac distincţie între celulele NK şi K, deoarece ambele categorii au receptori pentru Fc. Acţiunea lor principală este citotoxicitatea mediată de anticorpi (ADCC) faţă de celulele modificate antigenic.

Celulele LAK (*l*ymphokine *a*ctivated *k*iller = ucigaşe activate de limfokine) sunt celule efectoare ale citotoxicităţii *in vitro*, activate de IL–2 sau de interferonul α. Limfocitele din sângele periferic, cultivate *in vitro* în prezenţa IL–2 şi a antigenului tumoral devin intens citotoxice faţă de celulele tumorale omologe.

RECEPTORUL DE ANTIGEN AL CELULELOR T (RCT)

Deşi moleculele de anticorpi au fost printre primele a căror structură a fost cunoscută, receptorul de antigen al celulelor T s-a identificat biochimic foarte greu, deoarece nu a existat un echivalent celular T al tumorilor de mielom. Proteina receptor de antigen a celulelor T s-a identificat recent după ce a fost posibilă cultivarea liniilor de hibridom de celule T şi după producerea AMC faţă de moleculele de suprafaţă ale celulelor T. RCT are o largă variaţie biochimică, corespunzătoare specificităţii de legare a antigenelor.

Ca şi în cazul anticorpilor, pentru receptorul de antigen al celulelor T se foloseşte termenul de „idiotip" (Ti) pentru a desemna o moleculă a RCT cu un set unic de epitopi asociaţi, derivaţi din configuraţia sa spaţială unică pentru legarea specifică a unui antigen.

Pentru izolarea şi identificarea receptorului Ti s-au utilizat AMC anti Ti care precipită specific moleculele Ti dintr-un amestec complex de proteine membranare. Examinarea peptidelor în imunoprecipitatele diferitelor clone de celule T, prin metoda electroforezei în SDS–poliacrilamidă a evidenţiat că RCT este un heterodimer şi constă dintr-o glicoproteină de 80–90 kD, care în condiţii reducătoare se disociază în două peptide de 40 şi respectiv 43 kD. Molecula întreagă constă dintr-o pereche de lanţuri peptidice, similare ca dimensiuni, legate prin punţi S–S.

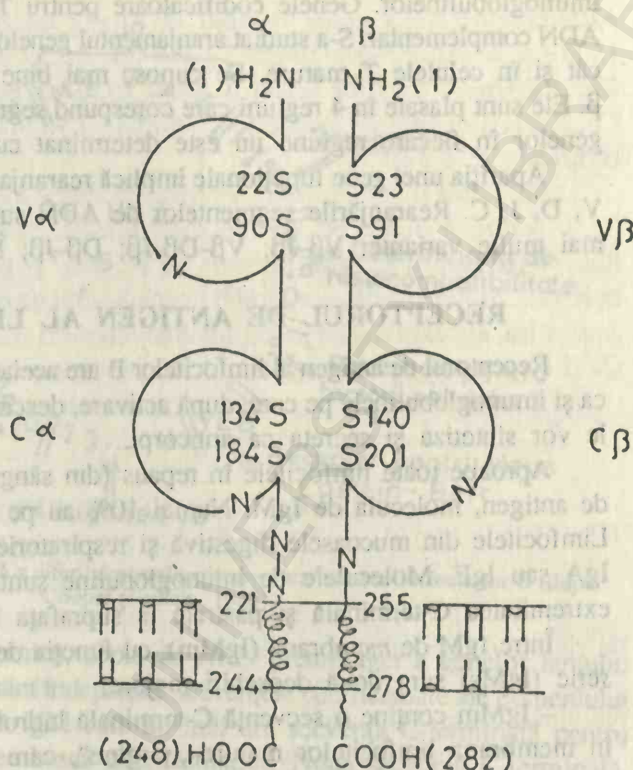


Fig. 29. Reprezentare schematică a structurii receptorului de antigen al limfocileor T, bazată pe date de biochimie şi de clonare a ADNc (după John şi Owen, 1985).

Cele două peptide sunt distincte şi s-au notat α şi β. Lanţul α are 248 aminoacizi (punctul izoelectric la pH = 5,0–5,5). Lanţul β are 282 aminoacizi (punctul izoelectric la pH = 6,5–7,0).

Fiecare lanţ are 4 domenii: variabil (Vα, Vβ), constant (Cα, Cβ), transmembranar şi intracitoplasmatic. Astfel construită, molecula RCT face parte din suprafamilia moleculelor de imunoglobuline. Se aseamănă cu lanţul L al imunoglobulinei, prin dimensiuni: domeniul variabil al fiecărui lanţ are 110 aminoacizi, dar pentru că se ancorează în membrană, se aseamănă cu lanţul H.

Domeniile variabile (α şi β) sunt extrem de variabile (asemenea regiunii V a imunoglobulinelor) şi sunt cele care determină specificitatea de legare cu antigenul.

La om, RCT heterodimer este asociat cu molecula T3, o grupare de 3 peptide asociate necovalent. Probabil funcţionează ca transductori de semnal de la Ti la citoplasmă, constituind un canal pentru trecerea ionilor de Ca^{2+} prin membrană.

Mecanismele genetice de generare a unei mari diversităţi a specificităţii de legare a Ti sunt similare cu acelea prezentate la generarea diversităţii

imunoglobulinelor. Genele codificatoare pentru Ti s-au studiat după clonarea ADN complementar. S-a studiat aranjamentul genelor atât în celulele T embrionare cât şi în celulele T mature. Se cunosc mai bine genele care codifică catena β. Ele sunt plasate în 4 regiuni care corespund segmentelor V, D, J, C. Numărul genelor în fiecare regiune nu este determinat cu certitudine.

Apariţia unei gene funcţionale implică rearanjarea celor 4 segmente separate V, D, J, C. Rearanjările segmentelor de ADN sunt mai versatile şi se fac în mai multe variante: Vβ-Jβ; Vβ-Dβ-Jβ; Dβ-Jβ; Dβ-Dβ.

RECEPTORUL DE ANTIGEN AL LIMFOCITELOR B

Receptorul de antigen al limfocitelor B are aceiaşi specificitate pentru antigen, ca şi imunoglobulinele pe care, după activare, descendenţii limfocitului respectiv le vor sintetiza şi secreta ca anticorpi.

Aproape toate limfocitele în repaus (din sânge şi ţesuturi) au ca receptor de antigen, molecula de IgM. Numai 10% au pe suprafaţă molecula de IgG. Limfocitele din mucoasele digestivă şi respiratorie au ca receptori de antigen IgA sau IgE. Moleculele de imunoglobuline sunt inclavate în membrană cu extremitatea C-terminală şi păstrate la suprafaţa limfocitului.

Între IgM de *m*embrană (IgMm), cu funcţia de receptor de antigen şi IgM *s*eric (IgMs) sunt două deosebiri majore:

– IgMm conţine o secvenţă C-terminală hidrofobă, prin care se ancorează în membrana limfocitelor mature „virgine", care nu au venit în contact cu antigenul specific. După stimulare, IgM nou sintetizat nu va mai fi ancorat în membrană, ci va fi secretat;

– IgMm este un monomer (H_2L_2), iar IgMs este pentamer $(H_2L_2)_5$.

Schimbarea de la forma IgMm la IgMs este rezultatul unor diferenţe ale modului de prelucrare a ARN premesager. Consecinţa lor este o secvenţă diferită de aminoacizi la capătul C-terminal al lanţului μ al IgMm şi IgMs.

Copia de ARN premesager a genei rearanjate a lanţului μ are două situsuri potenţiale de clivaj şi ataşare a resturilor poliadenilate, ce marchează capătul ARNm.

Secvenţa C-terminală a IgMm cuprinde 25 de aminoacizi hidrofobi, ce formează domeniul membranar, urmată de o secvenţă cationică lys-val-lys. Acest domeniu, ca la toate proteinele ancorate în membrană, formează un α-helix cu o lungime suficientă pentru a străbate membrana. Fiind hidrofobă asigură interacţiuni strânse cu lipidele membranei. Secvenţa cationică (cu sarcini pozitive) se extinde în citoplasmă şi ancorează ferm polipeptidul de membrana celulară.

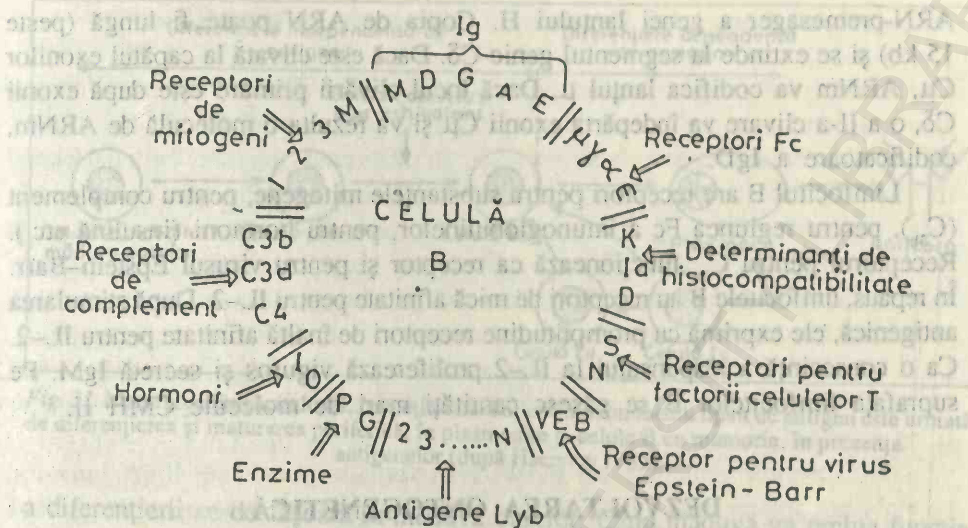


Fig. 30. Reprezentare schematică a diferitelor molecule membranare ale limfocitelor B (după Cooper şi colab., 1984).

După stimularea antigenică, copia de ARN premesager a genelor lanţului H este clivată la alt situs şi sunt îndepărtate secvenţele codificatoare ale domeniului membranar. Se sintetizează IgM care nu mai are secvenţa C-terminală pentru ancorarea lanţului μ în membrana citoplasmatică. Noua secvenţă C-terminală, de 19 aminoacizi conţine un rest de cisteină la poziţia penultimă, ce formează legăturile S–S dintre unităţile monomere ale pentamerului secretat.

Comutarea IgMm → IgMs nu modifică lanţul L al moleculei. Cele două forme ale IgM au domenii identice VH şi VL, adică au aceiaşi specificitate de legare a antigenului (au acelaşi idiotip).

După stimularea, antigenică, celula B comută sinteza de la IgMm la IgMs şi începe să producă lanţurile J necesare stabilizării IgMs pentamere.

Mecanismele diferite de prelucrare a ARN premesager sunt responsabile pentru sinteza IgM şi IgD în aceiaşi celulă. Multe limfocite B mature de memorie, pe lângă IgM exprimă pe suprafaţa lor molecule de IgD. Prezenţa simultană pe suprafaţa unui limfocit a lanţurilor μ şi δ, cu domenii V identice nu încalcă regula specificităţii unice a anticorpilor sintetizaţi de un limfocit. Având lanţul L comun şi domeniile VH identice, cele două izotipuri de anticorpi au aceiaşi specificitate de legare (acelaşi idiotip). Ele diferă numai la nivelul domeniilor constante ale lanţurilor H.

Prezenţa pe suprafaţa unui limfocit a lanţurilor μ şi δ, cu domenii V identice se explică prin variaţia mecanismelor de prelucrare a copiei de

ARN-premesager a genei lanţului H. Copia de ARN poate fi lungă (peste 15 kb) şi se extinde la segmentul genic Cδ. Dacă este clivată la capătul exonilor Cμ, ARNm va codifica lanţul μ. Dacă locul clivării primare este după exonii Cδ, o a II-a clivare va îndepărta exonii Cμ şi va rezulta o moleculă de ARNm, codificatoare a IgD.

Limfocitul B are receptori pentru substanţele mitogene, pentru complement (C_{3b}), pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor, pentru hormoni (insulină etc.). Receptorul pentru C_{3b} funcţionează ca receptor şi pentru virusul Epstein–Barr. În repaus, limfocitele B au receptori de mică afinitate pentru IL–2. După stimularea antigenică, ele exprimă cu promptitudine receptori de înaltă afinitate pentru IL–2. Ca o consecinţă a răspunsului la IL–2 proliferează viguros şi secretă IgM. Pe suprafaţa limfocitelor B se găsesc cantităţi mari de molecule CMH II.

DEZVOLTAREA ONTOGENETICĂ A SISTEMULUI IMUNOCITAR

Limfocitele T şi B se diferenţiază dintr-o celulă *stem* (celulă mamă, tulpină, de origine) care nu a fost identificată deoarece nu are caractere distinctive. Celula stem este pluripotentă, cu potenţial înalt de *diviziune şi diferenţiere* multiplă, chiar *totipotentă,* deoarece generează toate categoriile de celule sanguine: eritrocite, granulocite, monocite, limfocite, mastocite şi megacariocite. Diferenţierea iniţială este pe linia eritroidă şi mieloidă, iar cea pe linia limfoidă este ulterioară şi simultană cu procesul de maturare. Maturarea implică dobândirea imunocompetenţei, adică a capacităţii de a recunoaşte specific antigenul şi de a se activa.

Celula *stem* este de origine mezenhimală. La păsări şi mamifere celulele stem limfoide apar în *mezenhimul paraaortic* al embrionului. De aici ele migrează în *sacul vitelin,* unde se desfăşoară un timp activitatea hematopoetică, preluată ulterior în viaţa embrionară de *ficat şi splină.* Târziu în viaţa embrionară şi ulterior (după naştere şi ecloziune) *măduva osoasă* funcţionează ca organ hematopoetic, chiar dacă ficatul şi splina păstrează, la organismele foarte tinere, o activitate hematopoetică foarte limitată.

Sacul vitelin este sediul esenţial al diferenţierii celulelor stem, înainte de migrarea lor în ficat, splină, măduva oaselor. Prin cultivarea embrionului total de şoarece, fără sacul vitelin, înainte de migrarea celulelor stem limfoide, nu s-a evidenţiat diferenţierea celulară pe cale hematopoetică. La păsări, în ficat şi splină, celulele stem se divid cu o rată înaltă şi se diferenţiază pe linie eritrocitară, mieloidă (granulocitară), monocitară şi limfoidă. După ecloziune, această etapă

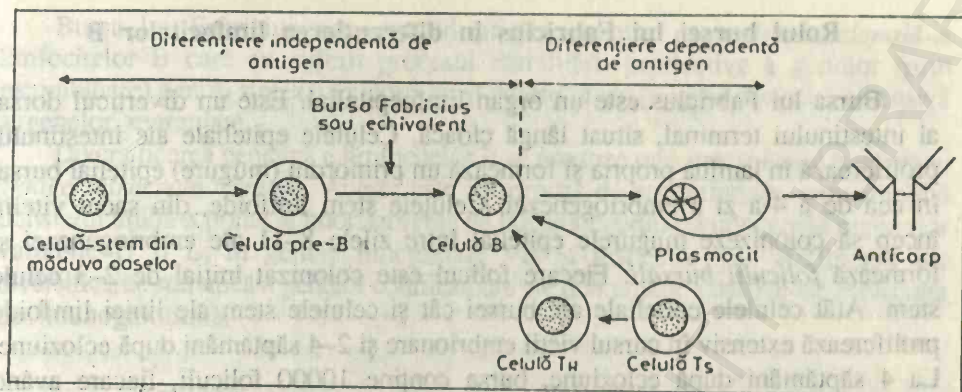


Fig. 31. Maturarea limfocitelor B. Inducția diferențierii într-un mediu lipsit de antigen este urmată de diferențierea și maturarea periferică, în plasmocite și celule B cu memorie, în prezența antigenelor (după Haenney 1985).

a diferențierii se desfășoară în măduva oaselor. Când măduva va prelua funcția hematopoetică, celulele limfoide rezultate aici vor migra inițial în splină și ficat, iar de aici în organele *limfoide centrale* (timus și bursa lui Fabricius).

La mamifere, din sacul vitelin, iar după naștere din măduva osoasă, celulele limfoide migrează în ficat și splină. De aici unele migrează în timus, iat altele își dobândesc competența imună în țesuturile de origine (ficat, splină, măduvă osoasă) care îndeplinesc funcțiile bursei la păsări. Acesta este *circuitul primar* al limfocitelor, în care se produce, diferențierea *independentă de antigen*, în cursul căreia limfocitele devin *imunocompetente*. Circuitul primar se desfășoară în *organele limfoide primare* (timus, bursa lui Fabricius și echivalenții bursali ai mamiferelor). În cursul lui, limfocitele dobândesc receptori specifici de antigen.

A II-a fază a diferențierii limfocitelor este *dependentă de antigen* și se produce în *circuitul secundar*. Limfocitele imunocompetente trec în circuitul sanguin și de aici migrează în țesuturile limfoide secundare, de unde prin intermediul limfei se reîntorc în sânge. În circuitul secundar, limfocitele întâlnesc antigenul specific receptorului lor, se activează, proliferează și se diferențiază spre stadiile de *celule efectoare* și *celule cu memorie*.

Nu se cunosc mecanismele moleculare care condiționează migrarea limfocitelor din splină și ficat în organele limfoide primare. Este un proces aleatoriu sau este programat de receptori celulari eventual dobândiți în aceste organe? Dacă este un proces condiționat, se poate presupune că în ficat celulele limfoide sunt deja celule pre–B (prebursocite) și vor migra în bursa lui Fabricius și respectiv pre–T (pretimocite) și vor migra în timus.

Rolul bursei lui Fabricius în diferențierea limfocitelor B

Bursa lui Fabricius este un organ limfoepitelial. Este un diverticul dorsal al intestinului terminal, situat lângă cloacă. Celulele epiteliale ale intestinului proliferează în lamina propria și formează un primordiu (mugure) epitelial bursal în cea de a 4-a zi a embriogenezei. Celulele stem limfoide, din sacul vitelin încep să colonizeze mugurele epitelial între zilele 8–11 ale embriogenezei și formează *foliculii bursali*. Fiecare folicul este colonizat inițial de 2–3 celule stem. Atât celulele epiteliale ale bursei cât și celulele stem ale liniei limfoide proliferează extensiv în cursul vieții embrionare și 2–4 săptămâni după ecloziune. La 4 săptămâni după ecloziune, bursa conține 10000 foliculi, fiecare având circa 10^5 limfocite. Bursa se menține până la 4–6 luni, când începe să involueze și se atrofiază la maturitatea sexuală.

Între celulele epiteliale ale bursei lui Fabricius și celulele liniei limfoide se stabilesc interacțiuni foarte strânse, esențiale pentru generarea diversității specificității antigenice a limfocitelor B circulante. Efectul său este mediat de factori humorali, ca de exemplu *bursopoetina*, un polipeptid mic, capabil să inducă diferențierea limfocitelor B *in vitro*.

Îndepărtarea primordiului bursal în cea de a 5-a zi de dezvoltare embrionară, sau ablația chimică a epitelinului bursal prin tratament cu testosteron nu influențează numărul de limfocite B circulante la pasărea adultă, dar anticorpii pe care îi sintetizează au o diversitate foarte restrânsă. Reiese deci, că bursa lui Fabricius nu este strict necesară pentru rearanjarea funcțională a genelor codificatoare ale sintezei imunoglobulinelor și nici pentru diferențierea limfocitelor B, dar are rol decisiv pentru producerea diversității clonale a limfocitelor B.

Bursa lui Fabricius este un organ limfoid specializat în care are loc *diversificarea somatică extensivă a genelor rearanjate* pentru sinteza anticorpilor, cât și *expansiunea clonală a limfocitelor*.

Spre deosebire de mamifere, la care generarea diversității celor circa 10^9 molecule diferite de anticorpi se face prin legarea combinatorială a segmentelor genice V–D–J (pentru lanțul H) și V–J (pentru lanțul L), linia aviană de evoluție a vertebratelor a exploatat altă strategie pentru producerea diversității moleculelor de anticorpi. În timpul dezvoltării embrionare a puiului de găină, potențialul generării diversității genetice prin procese de recombinare genică este limitat, deoarece regiunea variabilă a lanțului H și a lanțului L este codificată de regiuni funcționale unice V și J. Ca urmare, rearanjarea genelor în celulele liniei limfoide precursoare bursocitelor va produce o diversitate foarte limitată a moleculelor de anticorpi.

Bursa lui Fabricius este mediul prielnic pentru *expansiunea clonală* a limfocitelor B care au suferit procesul rearanjării productive a genelor (prin recombinare) pentru sinteza anticorpilor şi pentru *diversificarea somatică* extensivă a genelor rearanjate.

Diversificarea genetică a limfocitelor B se produce prin mecanismul *conversiei genice intracromosomale*. Acesta este un proces de recombinare, care implică transferul unidirecţional al unor secvenţe de nucleotide, din pseudogenele regiunilor variabile H şi L, în genele funcţionale VH şi respectiv VL. Astfel are loc diversificarea somatică a genelor codificatoare ale domeniilor variabile ale moleculei de imunoglobulină.

DIFERENŢIEREA LIMFOCITELOR B LA MAMIFERE

Diferenţierea liniei celulare B este ulterioară dezvoltării liniilor eritrocitară şi mieloidă.

La mamifere, primul organ în care are loc diferenţierea celulelor B este *ficatul fetal* în care se desfăşoară funcţia hematopoetică. Aceiaşi funcţie ar avea-o *splina fetală* şi chiar sângele circulant embrionar, care, străbătând diferite organe dobândeşte capacitatea de a induce maturarea limfocitelor B. Studiul diferenţierii celulelor B în ficatul mamiferelor este foarte dificil, deoarece ficatul nu se poate extirpa (aşa cum se procedează cu timusul şi cu bursa lui Fabricius), iar numărul limfocitelor este mic faţă de al celulelor liniei eritrocitare. Este greu de obţinut o populaţie omogenă de celule aflate în fazele preliminare ale maturării.

Celulele precursoare ale liniei B, generate în ficat şi în măduva osoasă nu au imunoglobuline de suprafaţă. În genomul lor are loc rearanjarea genelor V, D, J ale lanţului H. Odată cu aceasta suferă tranziţie rapidă şi devin limfoblaste mari, care se divid. Se formează celule pre-B mici, care au lanţul μ intracitoplasmatic, dar nu exprimă imunoglobuline de membrană (μ cit$^+$, L$^+$, Igm$^-$). Ulterior sunt rearanjate genele lanţului L şi după sinteza lanţului L, pe suprafaţa limfocitului B se exprimă moleculele imunoglobulinei. Prima imunoglobulină de suprafaţă a limfocitelor B este IgM, ca proteină integrală, cu o densitate de peste 200 000 molecule/celulă. Celulele B care exprimă numai IgM pe suprafaţa lor sunt imature. Alături de IgM poate să existe IgA sau IgG. Pe măsură ce diferenţierea celulelor B progresează, alături de IgM apare IgD, care ulterior devine dominantă. Celulele B mature în repaus au nivele mai înalte de IgD pe suprafaţa lor, decât IgM. Acestea sunt celule *imunocompetente*.

Celulele care nu reuşesc să genereze o rearanjare funcţională a genelor pentru sinteza lanţurilor H şi L sunt eliminate într-un stadiu timpuriu al

diferențierii lor. Celulele B purtătoare de IgM și IgD pe suprafața lor, după stimularea antigenică vor secreta fie IgM, fie IgG (una din subclase), fie IgA, fie IgE. Nu există diferențiere izotipică a unei linii celulare care să sintetizeze IgD.

TIMUSUL LA MAMIFERE

Timusul este un organ limfoid voluminos așezat în partea superioară a mediastinului anterior. Timusul are origine epitelială: derivă din ectodermul perechii a III-a de pungi branhiale și din endodermul celei de a III-a pungi faringiene. Cele două primordii epiteliale fuzionează și formează primordiul timic epitelial, care pierde legătura cu faringele și lumenul dispare. Timusul este primul organ limfoid care apare la păsări și mamifere. Primordiul timic este străpuns de celule

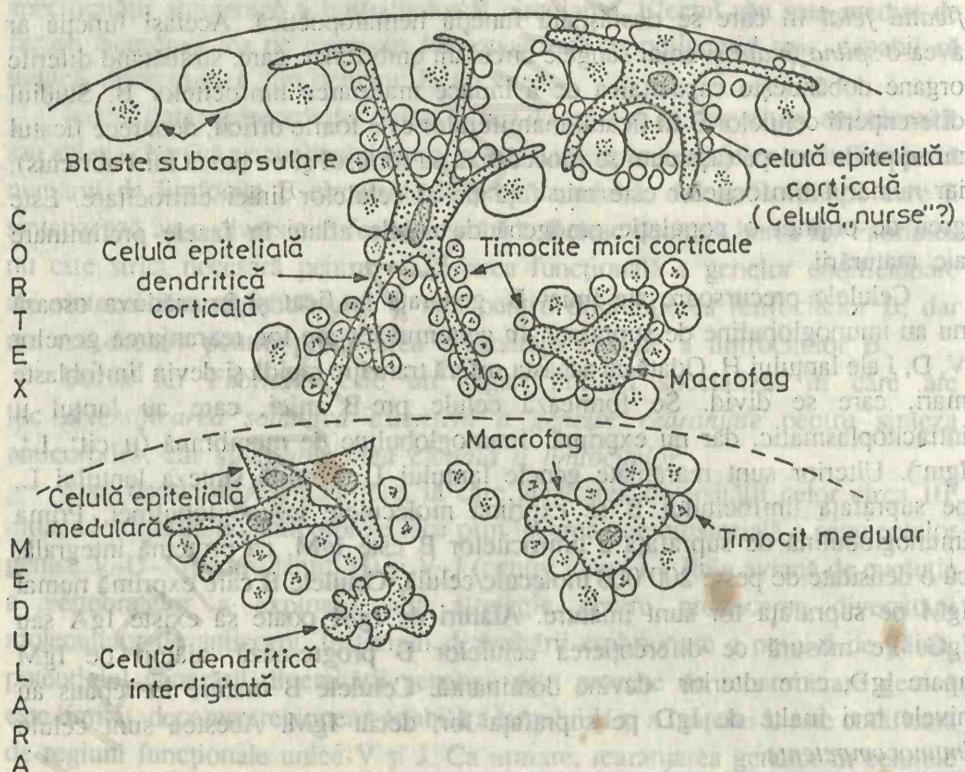


Fig. 32. Reprezentare schematică a principalelor tipuri de celule prezente în cortexul și în medulara timusului de șoarece (după Butscher și Weissman, 1984).

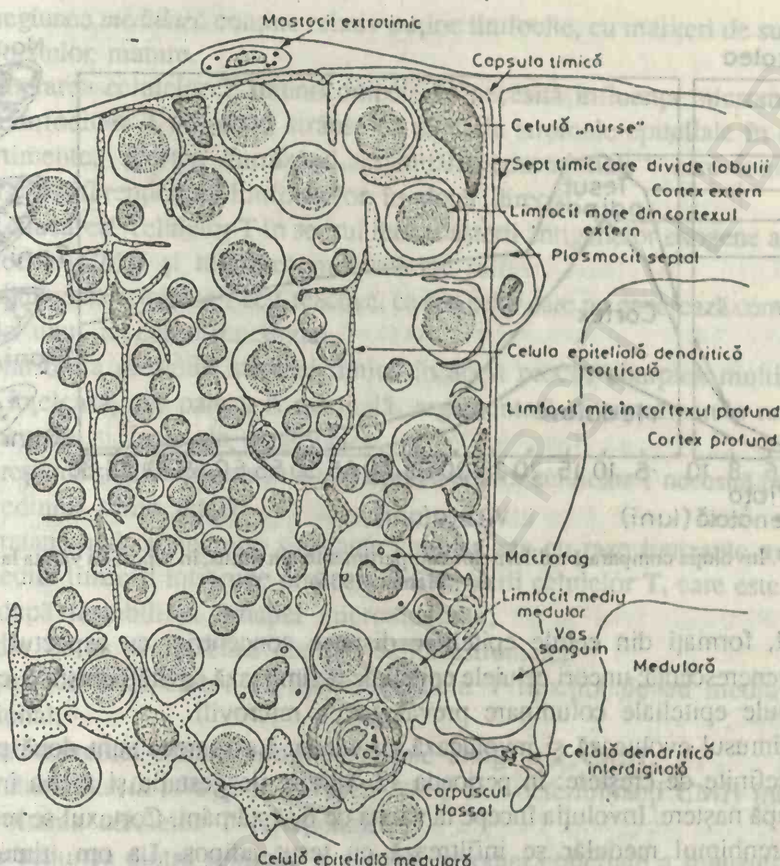


Fig. 33. Reprezentare schematică a arhitecturii generale a timusului. Subregiunile timusului sunt prezentate în dreapta figurii, iar constituienții lor celulari, în stânga (după Hood și colab., 1984).

stem limfoide cu originea în sacul vitelin (la șoarece în ziua a 11-a de dezvoltare embrionară). Apoi, celulele vin din ficat și mai târziu, din măduva osoasă. La om, la 20 săptămâni de sarcină timusul este complet dezvoltat.

Arhitectura timusului. Timusul este alcătuit din doi *lobi*. Fiecare lob este împărțit incomplet, de septuri conjunctive, în *lobuli*. Lobulii conțin o rețea de celule epiteliale, printre care sunt diseminate numeroase celule *limfoide (timocite)*. Epiteliul timic este diferențiat zonal: cortical și medular. În zona corticală predomină celulele epiteliale stelate, cu numeroase prelungiri fine care se interconectează. În zona medulară celulele epiteliale sunt mai mari, de formă ovală, cu prelungiri citoplasmatice scurte, bogate în organite secretoare. În zona medulară apar două tipuri de aglomerări ale celulelor epiteliale: corpusculii

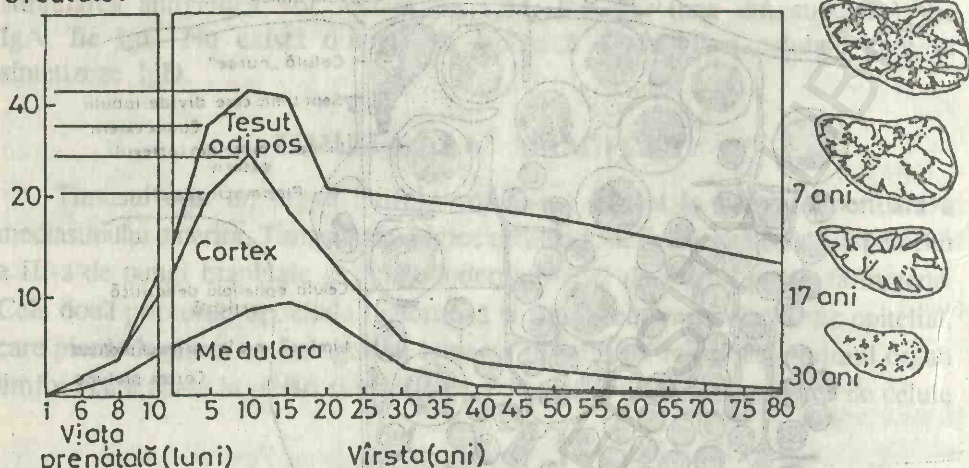


Fig. 34. Involuţia comparată a diferitelor compartimente din timus, în raport cu vârsta la om (după Hamar, 1936).

Hassal, formaţi din celule epiteliale dispuse concentric, cu aspectul general de degenerescenţă; uneori celulele epiteliale delimitează cavităţi chistice, căptuşite de celule epiteliale columnare prevăzute cu microvili.

Timusul evoluează şi involuează cu vârsta. La şoarece sunt două perioade bine definite de creştere: în perioada 13–18 zile de gestaţie şi a II-a între 3–6 zile după naştere. Involuţia începe la vârsta de 6 săptămâni. Cortexul se restrânge, iar parenhimul medular se infiltrează cu ţesut adipos. La om, timusul are dimensiunile maxime la pubertate. Apoi începe involuţia, dar nu dispare niciodată complet.

ROLUL TIMUSULUI ÎN DIFERENŢIEREA LIMFOCITELOR T

În zona corticală predomină limfocitele faţă de celulele epiteliale, iar în zona medulară raportul este invers. În timus, limfocitele T îşi dobândesc competenţa imună. Din punctul de vedere al distribuţiei limfocitelor, în timus se disting 4 regiuni funcţionale:

– regiunea *subcapsulară* conţine predominant limfocite imature, abia intrate în timus;

– *cortexul*, foarte bogat în limfocite care *proliferează* intens;

– joncţiunea *corticomedulară* funcţionează ca o *sită* celulară;

– regiunea *medulară* conţine relativ puţine limfocite, cu markeri de suprafaţă ai limfocitelor mature.

Generarea celulelor T imunocompetente necesită influenţa micromediului timic. Limfocitele T au relaţii strânse cu celulele stromale epiteliale în diferite compartimente, acestea furnizând „semnale educaţionale" care orientează maturarea (diferenţierea) limfocitelor în două direcţii:

– „educarea" celulelor T în sensul recunoaşterii antigenelor exogene asociate cu molecule CMH şi tolerarea moleculelor self;

– eliminarea celulelor T self-reactive, ca şi a celor care nu generează combinaţia genică a unui receptor funcţional.

Contribuţia celulelor stromei timice în acest proces complex multistadial e puţin înţeleasă, dar pare a fi esenţială, argumentată de următoarele rezultate experimentale şi fapte de observaţie:

– creşterea şi diferenţierea *in vitro*, a precursorilor celulelor T necesită prezenţa micromediului timic intact;

– tratamentul cu anumite substanţe chimice sau cu raze ionizante avariază micromediul timic şi întrerupe procesul diferenţierii celulelor T, care este reluat numai după restabilirea funcţiei micromediului;

– din timus se izolează complexe limfostromale;

– şoarecii nuzi cărora le lipsesc celulele T funcţionale au mediu timic nefuncţional;

– micromediul timic exprimă puternic antigenele CMH;

– tratamentul *in vivo* şi *in vitro* cu AMC anti-determinanţi CMH interferă cu dezvoltarea celulelor T funcţionale.

Interacţiunea dintre timocite şi celulele stromei epiteliale a timusului este esenţială pentru maturarea celulelor T. Celulele stromei exprimă molecule CMH II la densitate foarte înaltă şi într-o măsură mai mică, moleculele CMH I. Contactul celulelor epiteliale cu limfocitele conferă acestora imunocompetenţa sau capacitatea de a răspunde la antigene, de a produce limfokine, de a exercita funcţii reglatoare şi citotoxice. Se poate admite existenţa unor diferenţe ale micromediului care asigură maturarea celulelor T4 şi T8: probabil că celulele T4 se maturează la contactul cu suprafaţa bogată în molecule CMH II a celulelor epiteliale, iar celulele T8 se maturează în raport cu moleculele CMH I ale celulelor epiteliului timic.

Apariţia receptorului Ti pe limfocitele intratimice

Rearanjarea genelor pentru RCT se produce în cortexul timic, astfel că moleculele RCT se exprimă pe limfocitele intratimice în zona corticală, înainte de momentul ajungerii lor în zona medulară. Cu ajutorul AMC anti Ti marcaţi

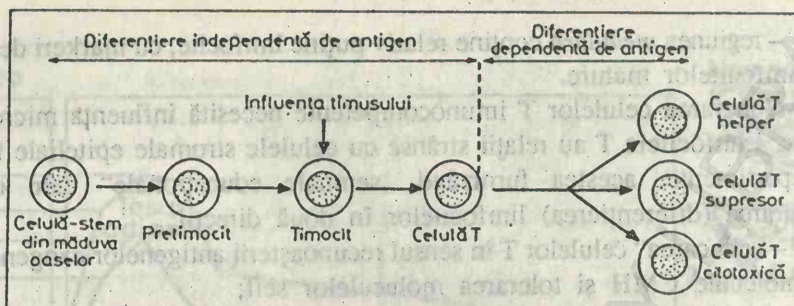


Fig. 35. Reprezentarea schematică a căilor de maturare a limfocitelor T. Diferenţierea în timus, independentă de antigen produce o populaţie de celule T specifice pentru antigen, imunocompetente, cu viaţă scurtă. În prezenţa antigenului specific, ele se diferenţiază în celule efectoare (după Haenney, 1984).

cu fluorocromi s-a evidenţiat că moleculele RCT apar în zona perinucleară a limfocitului din zona corticală. Ulterior, moleculele RCT migrează la suprafaţa celulei. Limfocitele care au raporturi strânse cu celulele reticulare epiteliale ale timusului evidenţiază o polarizare netă a coloraţiei anti-Ti spre membrana

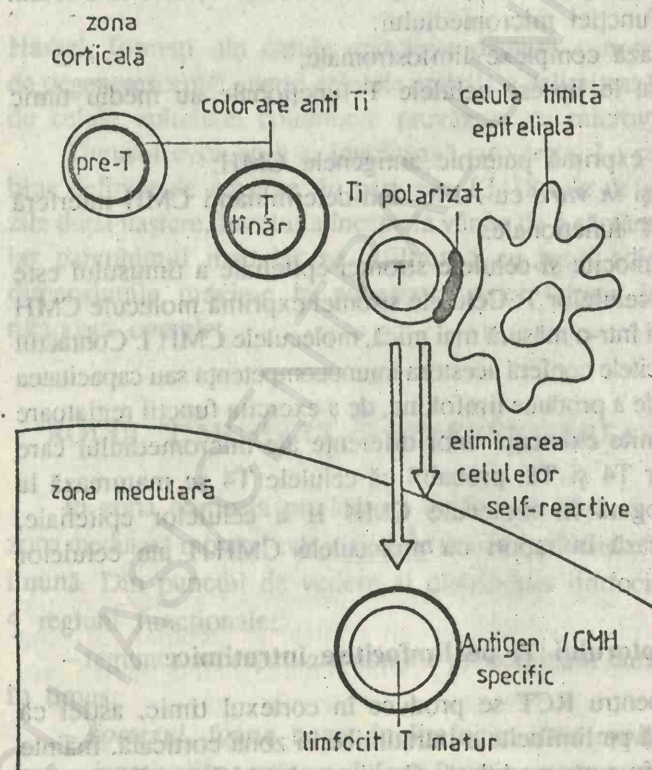


Fig. 36. Apariţia receptorului de antigen pe limfocitul T, detectabilă pe secţiunile de timus, colorate cu AMC anti-Ti, marcaţi cu substanţe fluorescente. Moleculele receptor apar, iniţial, în regiunea perinucleară. Ulterior moleculele Ti apar şi la nivelul membranei citoplasmatice a limfocitelor din zona corticală a timusului. Limfocitele aflate în strânsă asociaţie cu celulele epiteliale au receptori polarizaţi spre celula epitelială. Limfocitele din zona medulară au receptori de antigen distribuiţi uniform pe membrana citoplasmatică (după Male şi colab., 1987).

celulei epiteliale. S-a dedus că „educarea' limfocitelor T are loc în cursul interacțiunii cu celulele epiteliale prin intermediul moleculelor CMH, la care se adaugă un factor neidentificat al celulelor reticulare. În această etapă se dezvoltă toleranța limfocitelor T față de moleculele self și sunt eliminate cele self-reactive, la trecerea joncțiunii cortico-medulare, care se comportă ca o sită celulară.

FACTORII HUMORALI AI DIFERENȚIERII LIMFOCITELOR

Pe baza datelor experimentale acumulate se poate deduce existența a cel puțin două mecanisme care acționează în organele limfoide centrale, asupra diferențierii limfocitelor. Mecanismele propuse nu se exclud. Coexistența și sinergismul lor demonstrează importanța organelor limfoide centrale în controlul procesului de diferențiere și complexitatea acestuia. Majoritatea cercetărilor au fost făcute asupra factorilor de diferențiere ai timusului, dar rezultatele pot fi principial extrapolate asupra factorilor bursali ai diferențierii limfocitelor B la păsări.

S-au conturat două ipoteze referitoare la factorii de diferențiere ai limfocitelor: 1) ipoteza *celulară* și 2) ipoteza *hormonală* (humorală).

În acord cu ipoteza *celulară* a micromediului epitelial al timusului, diferențierea limfocitelor T s-ar realiza prin contactul direct al pretimocitelor cu epiteliul timic. Experiențele de extirpare a timusului la animalele nou născute, cu sistem imunitar imatur au evidențiat că prezența timusului funcțional este o condiție esențială pentru maturarea imunității mediate celular. Extirparea timusului la animalele nou născute este urmată de instalarea „sindromului de epuizare" ale cărui simptome se manifestă progresiv mai intens, și în esență reflectă incapacitatea organismului de a se apăra de infecțiile virale și fungice. Grefa timusului (de la organisme singenice) le restabilește treptat starea normală. Experiențele de extirpare a timusului la organisme mature au evidențiat că absența timusului este compatibilă cu viața, fără manifestarea unor deficiențe evidente. S-a dedus astfel, că mecanismele celulare de contact al limfocitelor cu celulele epiteliului timic ar fi active numai în primele faze ale maturării limfocitelor T, dar absolut necesare pentru diferențierea lor.

După datele actuale, mecanismul celular al influenței timice nu este suficient pentru diferențierea celulelor T. S-a emis ipoteza *hormonală*, care consideră că procesul de diferențiere și maturare imunitară ar continua după ce timocitele părăsesc timusul. Efectul factorilor humorali s-ar exercita asupra celulelor limfoide circulante, sau asupra celor localizate în organele limfoide secundare. Hormonul secretat de celulele epiteliului timic ar exercita o acțiune stimulatoare asupra

diferenţierii limfocitelor, atât intratimic cât şi la distanţă, după trecerea sa în circulaţie, continuând astfel influenţa directă a epitelilui timic.

În favoarea existenţei unui factor hormonal timic s-au adus argumente experimentale care pot fi grupate în 2 categorii:

1) Experienţe de *restabilire* a funcţiei timice numai sub acţiunea factorilor timici: îndepărtarea timusului la şoarecele nou născut este urmată de pierderea imunităţii mediate celular. Introducerea sub piele, la animalele timectomizate, a unei grefe de timus, plasată într-o cameră specială cu pereţi poroşi, permeabilă pentru molecule dar impermeabilă pentru celule restabileşte imunocompetenţa, ceea ce demontrează că nu este strict necesar contactul limfocitelor cu celulele epiteliului timic. Este suficient ca mediatorul (mediatorii) chimic secretat de timus să fie prezent în organism, pentru ca maturarea limfocitelor T să aibă loc. Pe de altă parte, şoarecii femele timectomizate la naştere îşi recapătă competenţa imunitară în timpul sarcinii sub influenţa hormonilor timici fetali, care trec în circulaţia maternă;

2) Evidenţierea factorilor timici prin metode *biochimice*: unii hormoni au fost izolaţi din timus, iar alţii din sânge. Nu sunt întru totul asemănători hormonilor convenţionali pentru că nu se pot substitui complet ţesutului timic şi pentru faptul că unele molecule din categoria hormonilor timici pot fi generate în alte ţesuturi. Factorii serici de origine timică dispar după timectomie şi reapar după grefa de timus. Existenţa factorilor serici de origine timică argumentează în favoarea ipotezei că imunocompetenţa se dobândeşte atât în faza timică a limfocitelor, cât şi la distanţă, după ce limfocitele au părăsit timusul.

Denumirea factorilor de imunocompenţă variază mult, în funcţie de origine, proprietăţi biochimice, efecte biochimice.

Timozinele (evidenţiate de Goldstein 1977) din cea de a 5-a fracţie proteică de extract timic de viţel reprezintă un grup de polipeptide cu g m. cuprinse între 1000 şi 15000 D, stabile la 80°. Prin combinarea cromatografiei schimbătoare de ioni şi gel-filtrare, din această fracţie s-au izolat 16 polipeptide. Ele induc sinteza MIF (factor inhibitor al microfagelor) de către limfocite, precum şi diferenţierea celulelor formatoare de anticorpi. De asemenea, reconstituie anumite funcţii imunitare la animalele timectomizate, cât şi în cazul hipofuncţiei timice la persoanele vârstnice, la care competenţa imunitară diminuă datorită involuţiei timusului. Din acest amestec polipeptidic, cel mai activ este un polipeptid de 108 aminoacizi (de 12 kD), căruia i s-a determinat secvenţa aminoacizilor. În mod obişnuit se izolează din timusul de viţel.

Timopoetina este un hormon polipeptidic al timusului, evidenţiat în primul rând datorită efectelor sale asupra transmiterii neuromusculare şi mai puţin prin acţiunea asupra sistemului imunitar. Bolnavii atinşi de *myasthenia gravis* prezintă

de regulă, o hiperplazie timică (timom). S-a creat sistemul experimental al acestei maladii, ceea ce a permis izolarea unui polipeptid care modifică transmiterea neuromusculară, iar la indivizii bolnavi provoacă oboseala musculară. Timopoetina este un polipeptid format din 49 aminoacizi, izolat din extractele de timus. Sunt două variante de tiomopoetină, care diferă prin doi aminoacizi şi stimulează activitatea limfocitelor T.

Factorul timič seric (FTS) lipseşte în serul şoarecelui nud, iar la animalele sănătoase dispare după timectomie dar reapare după grefa timică. Este un peptid cu g m 900, cu următoarea secvenţă a celor 9 aminoacizi: glu-ala-lys-ser-gln-gly-gly-ser-asn. Concentraţia FTS depinde de vârstă şi scade odată cu scăderea greutăţii timusului (20 ani la om şi 6 luni la şoarece).

Se pare că hormonii timici acţionează asupra limfocitelor T, după ce acestea au părăsit timusul. Efectul se exercită asupra tuturor categoriilor funcţionale de limfocite T: helper, supresoare, citotoxice.

Ubiquitina este un polipeptid ce conţine 74 aminoacizi (8,4 kD), care se găseşte în timus şi în majoritatea ţesuturilor la animale şi chiar la plante. Stimulează diferenţierea limfocitelor precursoare ale liniei T şi B, ceea ce explică păstrarea funcţiei imunitare după timectomizarea animalelor mature.

ORGANELE LIMFOIDE SECUNDARE (PERIFERICE)

Sistemul limfoid este alcătuit din *limfocite*, ca element celular esenţial şi din organele limfoide *primare* şi *secundare*.

Organele limfoide *secundare* reprezintă sediul structural al răspunsului imun şi sunt de două categorii:

– unele sunt *entităţi anatomice* dinstincte şi organizate (ganglionii limfatici, splina, plăcile Peyer, amigdale);

– altele sunt *formaţiuni limfoide difuze*, neorganizate ca entităţi structurale, dar sunt populate cu diferite categorii de celule, în care predomină limfocitele (ţesuturi limfoide asociate mucoasei gastrointestinale – *g*ut *a*ssociated *l*ymphoid *t*issue, (GALT) şi respiratorii (*b*ronchus *a*ssociated *l*ymphoid *t*issue (BALT).

Organele limfoide secundare au următoarele particularităţi funcţionale:

– sunt populate tardiv cu limfocite maturate în organele limfoide primare;

– la nivelul lor, limfopoeza este diminuată sau inexistentă;

– la nivelul lor, limfocitele părăsesc fluxul sanguin;

– extirparea lor totală este imposibilă

– conţin proporţia covârşitoare a limfocitelor;

– în prezenţa stimulului antigenic, limfocitele proliferează şi se diferenţiază, rezultând celule efectoare şi „de memorie".

Ganglionii limfatici

Ganglionii limfatici sunt organe limfoide secundare situate pe traseul vaselor limfatice. La suprafaţă prezintă o capsulă conjunctivă din care pornesc numeroase trabecule. În structura ganglionului limfatic se distinge *stroma*, formată din fibre şi celule reticulare, în ochiurile căreia se găsesc celule limfoide, macrofage, vase limfatice şi sanguine.

Ganglionii limfatici au o vascularizaţie dublă: limfatică şi sanguină. Limfa este adusă în ganglion prin cele 5–8 vase *limfatice aferente*, care se varsă în *sinusul* subcapular. De aici, printre trabeculele conjunctive pornesc radiar *sinusurile corticale*, care ulterior devin *sinusuri medulare*. Acestea se continuă cu vasele limfatice *eferente*.

Zona corticală este divizată în două zone: corticala *externă*, foarte bogată în limfocite B şi corticala *profundă* (paracorticală), populată de limfocite T (la şoarecele nud – atimic – corticala profundă este atrofiată).

În subzona corticală externă se găsesc numeroase aglomerări de limfocite, denumite *foliculi limfoizi primari*, cu diametrul de circa 1 mm, aşezaţi printre limfocitele dispersate uniform. Ei conţin, în special, limfocite mici. După stimularea antigenică, în timpul elaborării răspunsului imun, ei devin foliculi *limfoizi secundari*, datorită proliferării celulare intense, cu o zonă de mare densitate celulară denumită *centru germinativ*.

Zona medulară conţine ţesut limfoid dens, sub forma unor cordoane aşezate printre sinusurile medulare. Predomină limfocitele B, asociate cu macrofage, celule T. Sinusurile limfatice sunt căptuşite cu celule a căror suprafaţă apicală prezintă denivelări care încetinesc percolarea limfei prin ganglion.

Sângele circulă în direcţie opusă limfei. *Artera aferentă* pătrunde în ganglion la nivelul hilului şi se continuă cu *arteriolele*, care formează un bogat *plex*

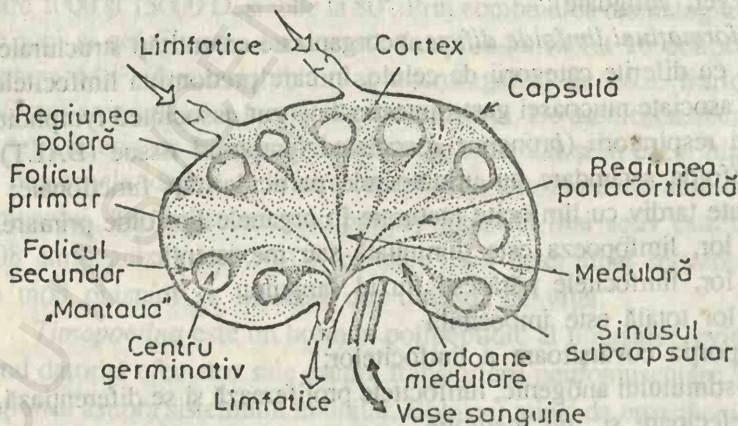


Fig. 37. Reprezentare schematică a arhitecturii unui ganglion limfatic (după Zola, 1985).

capilar. La nivelul cortexului profund, din plexul capilar se formează *venulele postcapilare cu endoteliu înalt.* La acest nivel, limfocitele *părăsesc* circulaţia sanguină prin celulele endoteliale şi se distribuie în zonele caracteristice: *celulele B în cortexul extern, iar celulele T în paracortex* (cortexul profund). După ce străbat lent teritoriile ganglionare specifice, limfocitele trec în zona medulară. Aici se colectează *sinusurile limfatice medulare,* care drenează limfa spre vasele limfatice eferente. Limfocitele părăsesc ganglionul prin *vasele limfatice eferente.*

Circulaţia lentă a sângelui în vasele din ganglionul limfatic, permite unui număr mare de limfocite să treacă din sânge în limfă, unde pot întâlni antigenul corespunzător. Se măreşte astfel şansa ca un număr mic de limfocite imunocompetente să întâlnească antigenul specific şi să reacţioneze proliferativ.

Funcţiile ganglionului limfatic sunt următoarele:

– filtrarea limfei şi reţinerea componentelor nonself (celule bacteriene, toxine etc.) de către fagocitele ganglionare;

– este suportul material al proliferării limfocitelor după stimularea antigenică. Limfa eferentă este filtrată şi îmbogăţită în anticorpi şi în limfocite.

După stimularea antigenică inductoare a RIMH, în subzona corticală externă (a celulelor B) se produc ample modificări citologice, iar după injectarea unui antigen timodependent, modificările citologice apar şi în subzona corticală profundă (a celulelor T).

Splina

Splina este cel mai mare organ limfoid, cu rol important în funcţia imunitară. Este un filtru sangvin, legat pe o derivaţie a marii circulaţii.

Splina este acoperită de o capsulă conjunctivă, de unde porneşte o reţea de trabecule conjunctive, ce împart ţesutul splenic în compartimente comunicante. În fiecare compartiment se găsesc *pulpa albă şi pulpa roşie.*

În trabeculele conjunctive se găsesc arterele trabeculare (ramificaţii ale arterei splenice). Când ating diametrul de circa 200 µm, arterele părăsesc trabeculele conjunctive şi pătrund în parenhimul splenic. Ele dau ramificaţii laterale (arteriole), fiecare fiind acoperită de un manşon dens de ţesut limfoid. Arteriola are o poziţie centrală în manşonul limfoid. În jurul ei se găsec limfocite distribuite într-o stromă conjunctivă, care constituie *teci limfoide periarteriolare* (PALS = *p*eri*a*rteriolar *l*ymphoid *s*heats) sau manşoane coaxiale de limfocite, în jurul arteriolelor. Totalitatea tecilor periarteriolare formează *pulpa albă* a splinei. Manşoanele au o zonă internă, bogată în limfocite T şi o zonă externă, bogată în limfocite B, şi plasmocite grupate în aglomerări denumite *foliculi.*

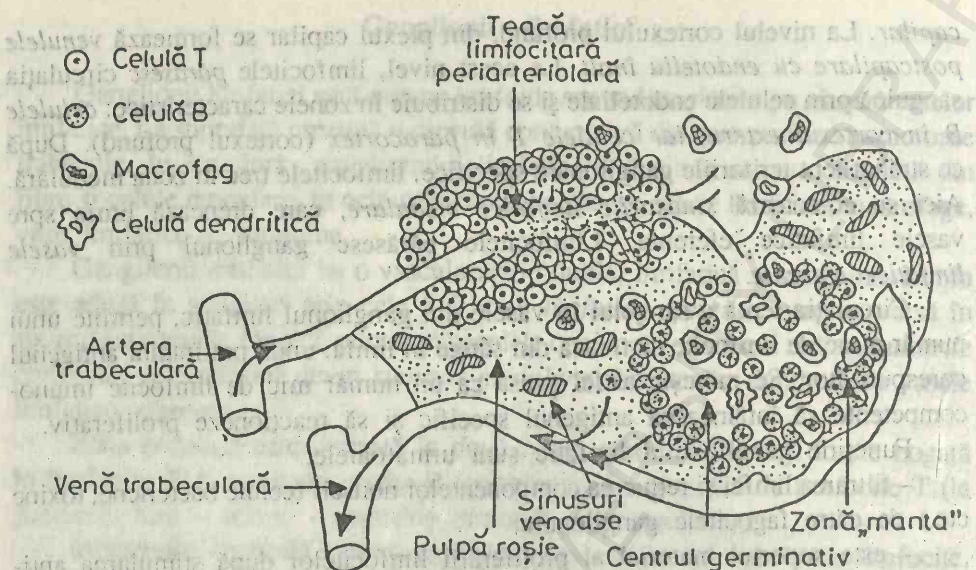


Fig. 38. Topografia regiunilor timus-dependente (TD) şi timus-independente (TI) în splină. Teaca limfocitară periarteriolară constituie regiunea TD, în timp ce foliculii limfoizi şi ţesutul limfoid adiacent reprezintă zona TI (după Cradock şi colab., 1971).

Unele arteriole, după ieşirea din pulpa albă (manşonul limfoid) dau numeroase ramificaţii „în perie", denumite arteriole penicilate care pătrund în *pulpa roşie.*

Pulpa roşie înconjură pulpa albă şi este formată din cordoane de ţesut splenic (cordoane Bilroth) şi sinusuri venoase (capilarele arteriolelor „în perie). Majoritatea arteriolelor penicilate se deschid în cordoanele Bilroth (circulaţie deschisă). Cordoanele Bilroth sunt formate dintr-o reţea tridimensională de celule reticulare şi fibre reticulare care formează o unitate funcţională cu adventicea sinusurilor. În această reţea se deplasează celulele libere cu funcţie fagocitară (macrofage). Cordoanele Bilroth comunică cu sistemul venos al splinei.

La nivelul cordoanelor Bilroth, circulaţia are caracter „deschis", deoarece sângele vine în contact direct cu celulele splenice.

În ochiurile cordoanelor Bilroth se găsesc *sinusurile.* Ele sunt capilare cu diametrul neuniform, tapetate cu celule din seria macrofagelor, care au rolul de a fagocita antigenele particulate. La acest nivel sunt captate şi hematiile îmbătrânite. În sinusuri se deschid o parte din arteriolele penicilate („circulaţia închisă").

Alte arteriole, după ieşirea din manşonul limfoid se termină în *capilarele zonei marginale,* al căror perete este foarte permeabil şi permite trecerea limfocitelor din sânge în pulpa albă (în teaca periarteriolară). Capilarele zonei marginale formează graniţa dintre pulpa albă şi pulpa roşie şi reprezintă *zona de schimb* dintre cele două compartimente. Din pulpa albă, limfocitele trec în capilarele marginale, apoi în sinusurile pulpei roşii şi de aici în sistemul venos al splinei.

În splină se găsesc *foliculii limfoizi primari*. Ei sunt localizaţi la periferia tecii limfoide periarteriolare, sau în imediata ei vecinătate.

Splina nu are circulaţie limfatică. La nivelul ei limfocitele ies din sânge prin peretele capilarelor zonei marginale, care este foarte permeabil şi se distribuie în pulpa albă, iar de aici străbat drumul invers şi ajung în pulpa roşie, în sinusurile venoase. Acestea comunică atât cu capilarele zonei marginale, cât şi cu sistemul venos al splinei.

Limfocitele părăsesc splina prin vena splenică.

Formaţiuni limfoide asociate mucoaselor

Mucoasele (digestivă, respiratorie, genitală, urinară) constituie, din punctul de vedere al contactului cu antigenele, structurile cele mai vulnerabile ale organismului uman şi animal. La nivelul lor, contactul permanent cu microorganismele creează condiţiile pătrunderii acestora în mediul intern. Mucoasele reprezintă nu numai o entitate anatomică, ci şi o entitate *imunologică*, conturată în anii ´60, cu particularităţi structurale şi funcţionale care tind să o delimiteze tot mai mult de aparatul imunitar sistemic. Mucoasele au un mod particular de recirculare a limfocitelor, care permite celulelor stimulate şi blastelor generate în structurile imunitare locale să revină cu o mare probabilitate în aceste zone. Mastocitele din structura mucoasei, prin mediatorii lor, permit modificarea condiţiilor locale ale circulaţiei.

Fundamental, sistemul imunitar al mucoaselor are o funcţionalitate precisă, destinată să excludă antigenele exogene, înainte ca ele să pătrundă în mediul intern şi să evite sau să minimalizeze expunerea aparatului imunitar sistemic la antigenele (moleculare sau celulare) care tind să pătrundă în mediul intern, dar să rămână insensibil la microbiota normală a mucoaselor. Prin calitatea sa de „zonă de control" a organismului cu antigenele, sistemul imunitar al mucoaselor are şi un rol reglator asupra funcţiei aparatului imunitar sistenic. Deficienţele sale funcţionale expun organismul şi aparatul imunitar sistemic, unei permanente stări de activare, care depăşeşte limitele fiziologice, consecinţa finală fiind instalarea stărilor de autoimunitate.

În mucoasa intestinală se află un mare număr de celule care reacţionează la antigenele din lumenul intestinal: macrofage, limfocite, plasmocite. Aceste celule sunt distribuite fie *difuz*, fie organizate în *structuri* distincte: foliculii limfoizi, plăcile Peyer, amigdalele.

Structurile limfoide asociate intestinului sunt lipsite de învelişul capsular şi de vasele limfatice aferente. Epiteliul intestinal care le acoperă se deosebeşte de restul epiteliului, fiind o barieră pentru antigenele particulate mari, dar având o mare permeabilitate care permite pătrunderea antigenelor solubile şi chiar a celor particulate mici. În lipsa vaselor limfatice, lichidul care scaldă structurile limfoide îndeplineşte funcţia limfei aferente.

Structurile limfoide asociate tractului digestiv (GALT = *g*ut *a*ssociated *l*ymphoid *t*issue) includ amigdalele (tonsilele palatine), plăcile Peyer, apendicele, plăcile limfoide ale colonului.

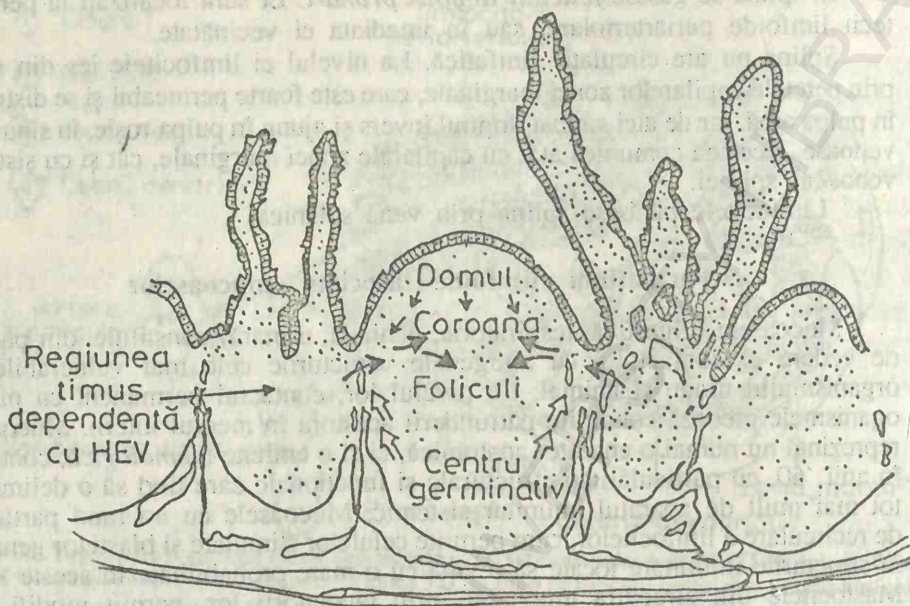


Fig. 39. Schema unei secţiuni printr-o placă Peyer. Săgeţile mici indică direcţia de scurgere a lichidului şi a antigenului, pe calea epiteliului care acoperă domul, spre plexul limfatic al nodulului. Săgeţile mari arată căile de migrare a limfocitelor din venulele cu endoteliu înalt (HEV), localizate în regiunile timus-dependente, prin domul şi „coroana" nodulului. Săgeţile duble indică direcţia probabilă de migrare a celulelor mitotice, din centrul germinativ, spre plexul limfatic (după Phillips-Quagliata şi Lamm, 1987).

Amigdalele se găsesc aşezate în unghiurile mandibulare. Dimensiunile unei amigdale măsoară 2,5 cm lungime, 1,5 cm lăţime şi 2 cm grosime. Sunt singurele structuri limfoide asociate tractului digestiv, acoperite de o capsulă, care aderă intim de ţesutul limfoid subiacent. Pe faţa internă, care priveşte spre vestibulul faringian se găsesc deschiderile criptelor tonsilare. Criptele pătrund adânc în masa limfoidă a tonsilei, facilitând contactul celulelor reactive (macrofage şi limfocite) cu antigenele pătrunse pe cale digestivă. Limfocitele care au pe suprafaţa lor Ig G sunt mult mai numeroase decât cele cu Ig A.

Foliculii limfoizi sunt structuri asociate caracteristice intestinului. Se găsesc fie ca foliculi solitari, de 0,5–2 mm, foarte numeroşi în partea terminală a ileonului, fie ca foliculi agregaţi denumiţi *plăcile Peyer*. Sunt situaţi în corionul mucoasei, dar pătrund şi în submucoasă. Au formă circulară sau alungită (eliptică) cu axul mare în lungul intestinului. Lungimea este variabilă între 1 şi 12 cm, iar lăţimea între 0,8–1 cm. O placă Peyer conţine 20–30 foliculi agregaţi. Se găsesc în ileonul terminal şi ocupă marginea liberă a intestinului (niciodată marginea mezenterică). La nivelul lor vilozităţile intestinale sunt reduse.

Fiecare folicul al plăcii Peyer conţine o aglomerare de macrofage, limfocite, plasmocite. Ariile interfoliculare sunt bogate în limfocite T. Structura foliculară individualizată este separată de lumenul intestinal prin structuri specializate denumite *domuri*: domul epitelial alcătuit din celule epiteliale turtite ale mucoasei intestinale şi domul conjunctiv subepitelial. La nivelul domului, epiteliul intestinal prezintă puţine celule mucoase şi puţini microvili, dar există în schimb, o categorie de celule specializate funcţional denumite *celule M* (*m*icrofold). Celulele M din epiteliul cubic captează antigenele solubile din lumenul intestinal prin pinocitoză. Nu se ştie dacă ele prelucrează materialul antigenic, înainte de a-l prezenta celulelor limfoide foliculare, cu care au raporturi structurale şi funcţionale strânse. Este posibil ca celulele M să îndeplinească numai rolul de transfer al antigenelor din lumenul intestinal, la structurile limfoide.

Accesul microorganismelor la epiteliul folicular are, în primul rând, consecinţe benefice deoarece pe această cale se iniţiază stimularea imunitară protectoare faţă de microorganismele luminale. Efectul nefavorabil este consecinţa faptului că epiteliul folicular al plăcii Peyer poate fi o cale de acces a microorganismelor patogene în organism (*Salmonella typhi*).

În foliculii limfatici din plăcile Peyer predomină celulele B, iar în zonele interfoliculare se găsesc preponderent celule T (subpopulaţia T_H). O proporţie importantă a limfocitelor nu are nici-un marker. Ariile T, la animalele timectomizate şi la cele congenital atimice sunt sărace în limfocite. La organismele germ free, plăcile Peyer sunt puţin dezvoltate. Pentru completa lor dezvoltare sunt necesare atât influenţele stimulatoare ale timusului, cât şi contactul cu microorganismele intestinale.

Structurile limfoide asociate intestinului (GALT) şi cele asociate aparatului respirator (BALT) au o bogată populaţie de limfocite IgA^+ ca marker de suprafaţă. În plăcile Peyer, dintre limfocitele IgA, majoritatea sunt IgM^+ şi numai foarte puţine sunt IgG^+. Celulele IgD^+ sunt restrânse ca distribuţie, la periferia foliculilor limfoizi.

Limfocitele B din foliculii limfoizi se află într-o stare de proliferare activă. Totuşi, numărul plasmocitelor este mic, ceea ce reflectă posibilitatea limfocitelor B din structurile GALT, de a migra în alte zone ale mucoasei, înainte de a se diferenţia în plasmocite.

Foliculul limfoid, ca unitate structurală a plăcii Peyer este străpuns de o arteriolă ascendentă, ce se termină într-o reţea capilară situată sub epiteliul folicular. Aceste capilare se conectează cu capilarele situate sub criptele adiacente foliculilor şi se continuă cu venulele postcapilare din ariile interfoliculare T-dependente.

A doua categorie de formaţiuni limfoide ale tractului digestiv sunt cele cu distribuţie *difuză*. Ele se găsesc în lamina propria şi în stratul epitelial al mucoasei. Celulele cu funcţie imunitară sunt foarte heterogene din punct de vedere funcţional. În lamina propria sa găsesc limfocite T şi B în proporţii egale şi un număr mare de plasmocite. Cele din stratul epitelial (limfocite intraepiteliale) sunt mai ales limfocite T citotoxice şi limfocite B cu markerul IgA^+. O proporţie mică de celule sunt IgM^+. Raportul celulelor IgA^+/IgM^+ este de 10–20/1. Cea mai mare parte a limfocitelor B sunt în curs de diferenţiere spre plasmocite.

În mucoasa intestinală se găsesc celule IgE^+, numărul lor fiind crescut la persoanele cu alergii alimentare.

Tabel comparativ privind principalele caracteristici ale organelor limfoide primare şi secundare

Caracteristici	Organe limfoide primare	Organe limfoide secundare
Originea	La zona de trecere între ectoderm şi endoderm. Conţin celule derivate din ectoderm şi din mezoderm (limfocite).	În mezoderm
Momentul dezvoltării	Foarte precoce în viaţa embrionară.	Tardivă în cursul vieţii fetale sau după naştere.
Rolul	Sunt populate timpuriu de celule precursoare ale limfocitelor şi au rol în dobândirea competenţei imunitare a acestora. Migrarea celulelor în organele limfoide primare nu ar fi aleatorie, ci ar avea înscrisă în genomul lor evoluţia într-un sens sau altul (celule pre-B şi pre-T).	Sunt populate numai de limfocite complet diferenţiate (maturate) la nivelul organelor limfoide primare.
Durata activităţii lor	La adult suferă o involuţie progresivă, care la vârstele înaintate este însoţită de o deficienţă a funcţiilor specifice imunitare.	Persistă toată durata vieţii organismului.
Activitatea mitotică	Este intensă şi este independentă de stimularea antigenică	Absentă în lipsa stimulului antigenic.
Formarea centrilor germinativi de reacţie după stimularea antigenică	Absentă	Foarte intensă
Efectele extirpării precoce	Reducerea numărului de limfocite şi diminuarea rapidă a reactivităţii imunitare	Nu este posibilă. Activitatea lor se poate bloca experimental. Reactivitatea imunitară diminuă, dar totdeauna rămân celule imunocompetente
Efectele extirpării tardive	Reducerea numărului de limfocite şi limitarea reactivităţii imunitare	Imposibilă
Funcţia esenţială	Centre de proliferare, maturare şi diseminare a limfocitelor	Focare ale răspunsului imun

Capitolul V

RĂSPUNSUL IMUN

Funcţionalitatea sistemului imunitar se suprapune modelului general al arcului reflex: presupune un flux informaţional care cuprinde un *excitant* specific (antigenul) faţă de un receptor (limfocitele), o cale *aferentă* (celulele care înglobează şi prelucrează antigenul), un *organ central* (celulele limfoide dintr-un organ limfoid periferic), o cale *eferentă* (amplificarea mitotică şi diferenţierea limfocitelor) şi *efectorii* răspunsului imun (anticorpi, celule efectoare).

Asemănările dintre sistemul imunitar şi sistemul nervos se extind şi asupra altor particularităţi:

– sistemul imunitar este dotat, ca şi sistemul nervos cu „inteligenţă" (capacitatea sa de a recunoaşte un număr mare de determinanţi antigenici diferiţi). „Inteligenţa" sistemului imunitar se manifestă *discontinuu* în funcţie de agresiunile externe asupra organismului;

– „educaţia" sistemului imunitar (informaţia primită prin stimulări antigenice), ca şi în cazul sistemului nervos, începe după naştere;

– ambele sisteme „învaţă' prin experienţă, ambele sunt dotate cu „memorie" care poate fi consolidată prin repetarea stimulului. Memoria ambelor sisteme este înscrisă prin modificări persistente ale reţelei, dar nu poate fi transmisă la descendenţi;

– ambele sisteme sunt organizate după modelul unei complexe reţele celulare şi moleculare.

Între cele două sisteme există şi deosebiri: sistemul nervos recepţionează stimuli de orice natură, care acţionează la nivelul întregului organism, iar sistemul imunitar recunoaşte şi reacţionează numai la stimulii de natură moleculară, care tind să perturbe echilibrul organismului.

Organismul ca sistem funcţional este echilibrat atâta timp cât informaţia pe care o primeşte este identică cu cea proprie. Faţă de moleculele străine care

se abat de la modelul informaţional propriu, sistemul imunitar răspunde prin activarea mecanismelor de recunoaştere pentru a le îndepărta.

PARTICULARITĂŢILE GENERALE ALE RĂSPUNSULUI IMUN

Ansamblul fenomenelor complexe, în cascadă, declanşate de interacţiunea specifică a sistemului imunitar cu antigenul, în cursul cărora celulele imunocompetente se activează, proliferează şi se diferenţiază în celule *efectoare* şi celule cu *memorie* constituie răspunsul imun.

Elaborarea răspunsului imun faţă de o substanţă nonself este un proces fiziologic ce se caracterizează printr-o mare eficienţă şi supleţe şi prezintă următoarele trăsături generale:

– funcţia sistemului imunitar are caracter *adaptativ*, care decurge din orientarea specifică a reacţiilor sale faţă de o anumită substanţă nonself. Caracterul adaptativ al răspunsului imun implică mobilizarea unor celule *preprogramate*, care aşteaptă să fie activate de un anumit antigen, corespunzător specificităţii lor;

– caracterul foarte *economic* al activităţii sistemului imunitar derivă din specificitatea acţiunii sale. În timpul răspunsului imun se selecţionează şi se activează numai subpopulaţiile celulare care au recunoscut specific substanţa nonself, toate celelalte clone celulare rămânând disponibile pentru alte interacţiuni;

– *eficienţa* funcţiei imunitare derivă din caracterul foarte economic al mijloacelor celulare şi moleculare pe care le mobilizează şi din capacitatea de a *amplifica* efectorii săi, pe două căi: a) proliferarea masivă (circa 8 generaţii celulare) a celulelor selecţionate sub acţiunea stimulatoare a substanţei nonself. În timpul activării se produc modificări funcţionale calitative ale acestor celule, de diferenţiere proliferativă şi maturare, rezultatul fiind generarea celulelor efectoare cu mare capacitate de acţiune şi a celulelor de *memorie*; b) celulele *efectoare* produc cantităţi mari de *molecule de recunoaştere*, sub forma receptorilor specifici faţă de substanţa nonself. Eficienţa răspunsului imun este condiţionată de eliberarea mediatorilor cu rol stimulator al diferitelor interacţiuni celulare (interleukine şi interferoni);

– celulele sistemului imunitar *cooperează* stimulator cu numeroase alte celule, capabile să confere la rândul lor, rezistenţa organismului. Cooperarea are loc inclusiv cu factorii nespecifici (neadaptativi) ai imunităţii naturale (fagocitele, sistemul complement, molecule bactericide sau bacteriolitice din ser);

– intrarea în acţiune a sistemului imunitar adaptativ necesită o *perioadă de timp* pentru activarea şi proliferarea limfocitelor care au recunoscut antigenul, în timp ce reacţiile neadaptative sunt prompte (imediate);

– reacţiile adaptative asigură protecţia organismului şi a descendenţilor săi, prin transferul placentar al anticorpilor şi prin secreţia lactată;

– reacţiile adaptative au o proprietate fundamentală unică – *memoria imună*, consecinţă a experienţei antigenice individuale, netransmisibilă la descendenţi.

Răspunsul imun este rezultatul cooperării unui număr restrâns de tipuri celulare şi moleculare. În funcţie de predominanţa componentei humorale sau celulare se disting două tipuri de răspuns imun:

1) *Răspunsul imun mediat humoral (RIMH)* se caracterizează, în esenţă, prin producerea anticorpilor. Efectul său constă în inactivarea virusurilor, neutralizarea toxinelor, opsonizarea (sensibilizarea) bacteriilor. Imunitatea mediată hormonal este transferabilă de la un organism la altul prin intermediul serului. RIMH este protector faţă de infecţiile bacteriene (în special piogene), faţă de reinfecţiile virale şi faţă de antigenele solubile (proteine), pe care le neutralizează.

2) *Răspunsul imun mediat celular (RIMC)* se caracterizează prin faptul că după contactul cu antigenul, celulele efectoare se sensibilizează şi atacă antigenul ţintă, care de regulă este celular. Atacul se realizează fie prin contact celular direct (între celula T efectoare şi celula ţintă), fie prin mediatori moleculari. RIMC este declanşat de antigene care se exprimă pe suprafaţa celulelor (antigene virale pe celulele infectate – în special după infecţia virală primară), de antigene fungice, de bacteriile cu localizare intracelulară (*M. tubersulosis*, *M. leprae*, *Listeria* sp., *Brucella* sp.), de antigenele tumorale, de grefele de ţesuturi şi organe alogenice.

Dualitatea răspunsului imun este argumentată de rezultatele experimentale, dar în special de observaţiile clinice, adevărate experienţe ale naturii, asupra unor indivizi cu afecţiuni determinate de incapacitatea RIMH sau RIMC:

– *sindromul Di George* se caracterizează prin aplazia timusului şi paratiroidelor. Bolnavilor le lipseşte reactivitatea faţă de antigenele care în mod obişnuit induc reacţii de hipersensibilitate întârziată. Sinteza imunoglobulinelor este normală. Sunt sensbili la infecţiile virale, fungice şi cu bacterii intracelulare;

– *hipo- şi agamaglobulinemia* congenitală de tip Bruton este o afecţiune ereditară determinată de gene situate pe cromosomul X, care afectează diferenţierea celulelor pe linia limfoidă B. Lipsesc limfocitele B mature (numărul limfocitelor pre-B este normal) din sângele circulant. Scade accentuat titrul imunoglobu-

linelor serice. Timusul este normal, ca şi IMC. Deficienţa clinică constă în incapacitatea de a sintetiza anticorpi şi din această cauză, copiii după 3–6 luni de viaţă fac infecţii repetate şi recurente cu bacterii Gram pozitive, maladii autoimune. Rezistenţa faţă de infecţiile virale şi faţă de bacteriile Gram negative este neafectată.

Separarea celor două compartimente ale răspunsului imun, humoral şi celular este artificială. Între ele este o condiţionare reciprocă şi profundă: anticorpii au funcţie opsonizantă, favorizând astfel RIMC, iar pe de altă parte, la RIMC participă numeroşi factori solubili. Cele două compartimente interacţionează sinergic pentru producerea unui răspuns imun eficient. Separarea este menţinută deoarece reflectă diferenţele fundamentale ale mecanismelor de acţiune ale celor două linii de limfocite implicate: limfocitele B pentru RIMH şi limfocitele T, pentru RIMC. Nici un antigen nu induce un răspuns imun pur, humoral sau celular. Totdeauna răspunsul imun este *mixt*, cu predominanţa unuia sau a celuilalt dintre compartimente.

ETAPELE RĂSPUNSULUI IMUN

Răspunsul imun este rezultatul succesiunii următoarelor etape:

– *pătrunderea* antigenului în organism şi înglobarea lui de către celulele accesorii;

– *prelucrarea* antigenului şi prezentarea epitopilor pe suprafaţa celulelor accesorii;

– *recunoaşterea* specifică a componentelor nonself şi *activarea* celulelor efectoare;

– *producerea* efectorilor răspunsului imun.

Pătrunderea antigenului în organism se realizează pe diferite căi: prin tegument, pe calea circulaţiei sanguine, pe calea mucoaselor (respiratorie şi gastrointestinală).

Elaborarea răspunsului imun este, în esenţă, rezultatul cooperării a două categorii de celule: celulele *accesorii* ale răspunsului imun şi celulele *limfoide*.

Celulele *accesorii* au rol esenţial în desfăşurarea răspunsului imun, datorită capacităţii lor de a îngloba substanţele străine, de a le prelucra şi de a le prezenta limfocitelor, de a fagocita celule opsonizate şi de a sintetiza substanţe imunomodulatoare.

Iniţial s-a considerat că macrofagele sunt singurele celule accesorii ale răspunsului imun, dar, de fapt, orice celulă care poartă pe suprafaţa sa molecule CMH poate să participe la elaborarea răspunsului imun.

Pentru declanşarea răspunsului imun faţă de antigenele exogene, cele mai active *celule prezentatoare de antigene* (CPA) sunt macrofagele, celulele dendritice şi limfocitele B.

Celulele *dendritice* constituie un sistem de celule esenţiale pentru iniţierea răspunsului imun faţă de antigenele timodependente, ce pătrund pe cale tegumentară sau sanguină. Ele au funcţia de a prezenta antigenul şi se găsesc în organele limfoide secundare. Din acest sistem fac parte:

– *celulele Langerhans* din stratul bazal al epidermei;

– *celulele cu „voal" (văl)* din limfa aferentă şi celulele *dendritice* din sânge;

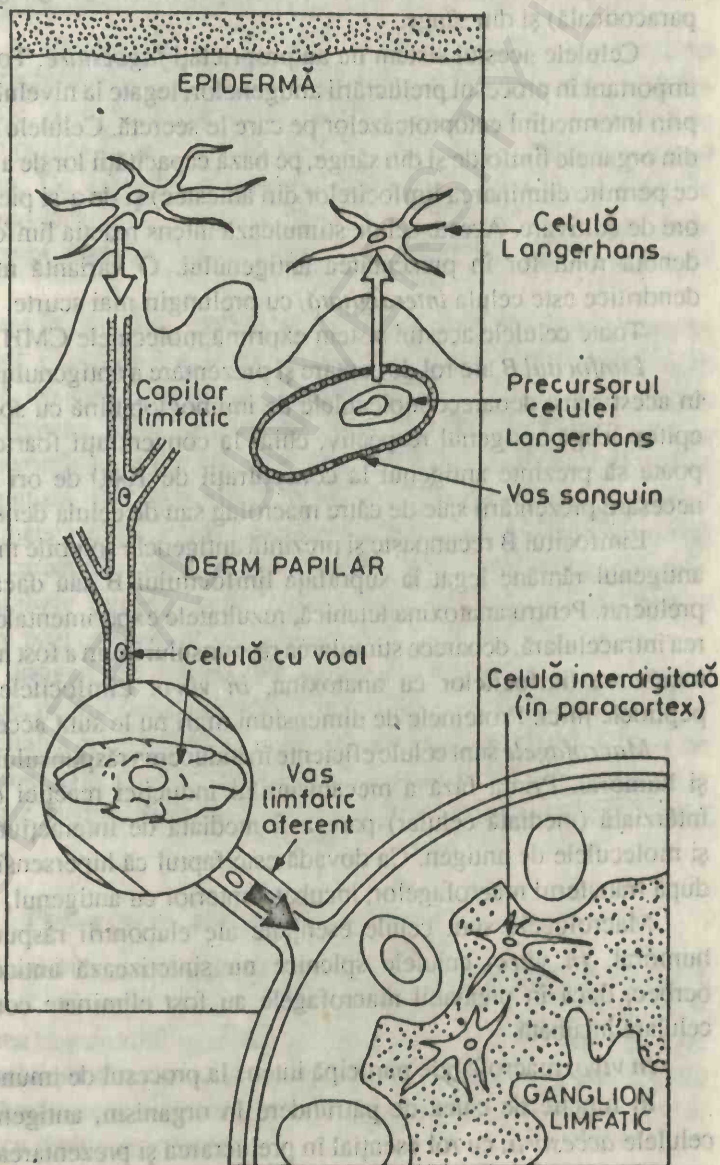


Fig. 40. Circulaţia celulelor Langerhans din piele, în ganglionii limfatici regionali. Ele părăsesc sediul tegumentar, „încărcate" cu antigen, pentru a trece în limfaticele aferente, unde apar sub forma celulelor cu „voal" şi ajung în regiunea paracorticală a ganglionilor limfatici, unde formează celulele interdigitate (după Male şi colab., 1987).

– celulele dendritice şi *interdigitate* din organele limfoide secundare.

Originea acestor celule nu este certă, dar se admite următoarea filiaţie: monocitul sanguin → celula Langerhans din epidermă → celula cu văl din limfa aferentă ganglionului limfatic → celula dendritică din ganglionii limfatici (zona paracoticală) şi din sânge.

Celulele acestui sistem nu au proprietăţi *fagocitare*. Totuşi, li se atribuie rol important în procesul prelucrării antigenelor, legate la nivelul membranei celulare, prin intermediul ectoproteazelor pe care le secretă. Celulele dendritice s-au izolat din organele limfoide şi din sânge, pe baza capacităţii lor de a adera de suport (ceea ce permite eliminarea limfocitelor din amestec) şi de a-şi pierde aderenţa după 24 ore de cultivare. Aceste celule stimulează intens reacţia limfocitară mixtă, ceea ce denotă rolul lor în prezentarea antigenului. O variantă morfologică a celulei dendritice este celula *interdigitată*, cu prelungiri mai scurte.

Toate celulele acestui sistem exprimă moleculele CMH II.

Limfocitul B are rol de captare şi prezentare a antigenului, fiind foarte eficient în acest sens, deoarece moleculele de imunoglobulină cu specificitate faţă de un epitop leagă antigenul respectiv, chiar la concentraţii foarte mici. Limfocitul B poate să prezinte antigenul la concentraţii de 1000 de ori mai mici decât cele necesare prezentării sale de către macrofag sau de celula dendritică.

Limfocitul B recunoaşte şi prezintă antigenele solubile mici. Nu este cert dacă antigenul rămâne legat la suprafaţa limfocitului B sau dacă este internalizat şi prelucrat. Pentru anatoxina tetanică, rezultatele experimentale sugerează prelucrarea intracelulară, deoarece stimularea răspunsului imun a fost mult mai intensă după incubarea limfocitelor cu anatoxina, *in vitro*. Limfocitele B captează numai peptidele mici. Proteinele de dimensiuni mari nu le sunt accesibile.

Macrofagele sunt celule eficiente în inducerea răspunsului imun mediat celular şi humoral. Prima fază a mecanismului inducţiei reacţiei de hipersensibilitate întârziată (mediată celular) pare a fi mediată de interacţiunea dintre macrofag şi moleculele de antigen. Ca dovadă este faptul că hipersensibilitatea este indusă după transferul macrofagelor, incubate anterior cu antigenul, *in vitro*.

Macrofagele sunt celule esenţiale ale elaborării răspunsului imun mediat humoral. *In vitro*, celulele splenice nu sintetizează anticorpi antihematii de berbec, dacă în prealabil macrofagele au fost eliminate complet din populaţia celulară incubată.

In vivo, macrofagele participă intens la procesul de imunogeneză.

În funcţie de calea de pătrundere în organism, antigenele sunt captate de celulele *accesorii*, cu rol esenţial în prelucrarea şi prezentarea antigenelor, limfocitelor care recunosc şi interacţionează specific cu epitopii nonself. Antigenele care pătrund pe cale tegumentară sunt captate de macrofagele din ganglionii regionali.

Cele care pătrund pe cale digestivă sunt captate de macrofagele din plăcile Peyer şi din amigdale. Cele care pătrund pe calea circulaţiei sanguine sunt captate de macrofagele şi celulele dendritice din splină. Cea mai mare parte a antigenelor circulante sunt eliminate înainte de a declanşa răspunsul imun, în primul rând de celulele Kupffer, care căptuşesc capilarele sinusoide din ficat. Aici se elimină cea mai mare parte (90%) a antigenelor circulante (bacterii care străbat bariera mucoasei digestive, endotoxine absorbite la nivelul intestinului gros).

Prima treaptă a interacţiunii antigenului exogen cu CPA este legarea nespecifică prin interacţiuni necovalente ale antigenului, cu structuri nedeterminate ale suprafeţei celulare. Antigenele din complexele imune se pot lega specific de CPA, prin receptorii pentru Fc şi C3. Antigenele care nu se leagă de CPA nu vor induce răspuns imun. De exemplu, macrofagele alveolare nu leagă antigenele bacteriei *Listeria monocytogenes*. Dacă celulele bacteriene sunt mai întâi opsonizate cu anticorpi specifici, macrofagele alveolare vor lega şi prezenta aceste antigene.

După ce a pătruns în organism, antigenul este repede înglobat şi depozitat în interiorul macrofagelor. Faptul că antigenul este scos din circulaţie are o semnificaţie funcţională deosebită, deoarece constituie un depozit din care este eliminat treptat şi stimulează imunogeneza. Persistenţa antigenului liber în organism ar putea induce două stări defavorabile pentru răspunsul imun: a) eliminarea masivă şi rapidă a antigenului din organism, fără stimularea răspunsului imun; b) dozele prea mari de antigen sunt deasemenea defavorabile răspunsului imun, prin blocarea reactivităţii limfocitelor. Starea caracterizată prin incapacitatea de răspuns imun a organismului se numeşte „paralizie imunologică". Este o stare de blocare completă a reactivităţii imunitare prin „inundaţie antigenică".

O mică parte a antigenului injectat este reţinută în macrofage sub o formă rezistentă la degradare, pentru perioade mai lungi de timp, deşi cantitatea sa scade progresiv. Imunogenitatea antigenelor asociate macrofagelor depinde de tipul de antigen. Cele slab imunogene, după legarea de macrofag, devin mai imunogene, iar cele cu imunogenitate nativă ridicată îşi pierd parţial această calitate, după legarea de macrofag.

Prelucrarea antigenelor exogene

Limfocitele T(Th şi Tc) nu recunosc şi nu preiau direct informaţia antigenică solubilă. Limfocitele T recunosc numai antigenele legate de suprafaţa CPA şi participă la declanşarea răspunsului imun faţă de antigenele solubile T-dependente şi faţă de antigenele celulare. Pentru activarea celulelor T este necesară o prealabilă prelucrare a acestor două categorii de antigene, de către celule specializate, care le prezintă în asociaţie cu moleculele CMH.

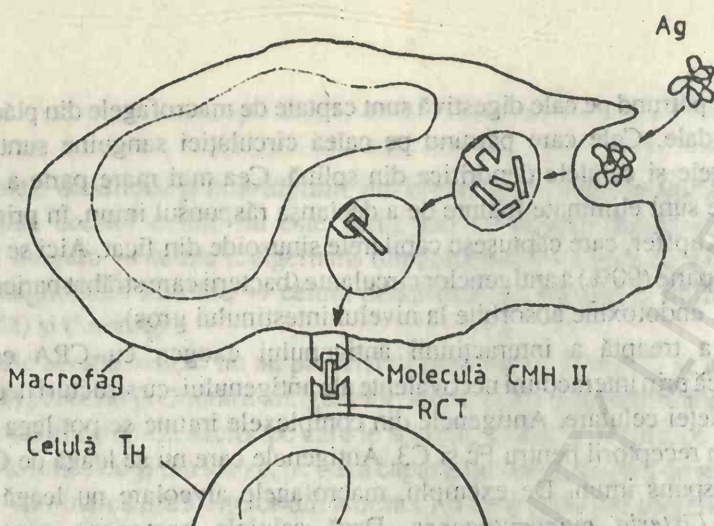


Fig. 41. Majoritatea antigenelor exogene sunt prelucrate şi prezentate de macrofage, în asociaţie cu moleculele CMH clasa II-a (după Grey şi colab., 1989).

Evenimentele metabolice ale prelucrării antigenelor sunt puţin cunoscute. În macrofage se produce o *digestie selectivă* a antigenelor, în urma căreia o parte din epitopi se păstrează, iar cea mai mare parte a antigenului este complet degradată.

Între momentul legării antigenului de CPA şi recunoaşterea sa de către celulele T, există o perioadă de lag de 45–60 min. Durata sa s-a determinat prin inactivarea metabolică a macrofagelor cu paraformaldehidă, la diferite intervale de timp după contactul cu antigenul. Acest interval este cel mai mic necesar, pentru ca antigenul să fie prelucrat şi prezentat. Macrofagele inactivate după intervalul de 45–60 min stimulează activarea celulelor T.

Experienţele cu antigen marcat au evidenţiat că în CPA, materialul imunogen are două destinaţii: o parte este expusă pe suprafaţa celulei şi este recunoscută de celulele T, iar o altă parte este sechestrată în celulă de unde este eliminată activ în mediul extracelular şi este preluată de alte CPA.

Principalul mecanism degradativ care are loc în CPA este *proteoliza lizosomală*. Concluzia a fost dedusă din faptul că amoniacul şi cloroquina, care se localizează în lizosomi, blochează degradarea proteinelor prin creşterea pH lizosomal. Macrofagele astfel tratate sunt incapabile să prezinte antigenele proteice sau bacteriene. Cloroquina blochează numai etapa prelucrării antigenului, dar nu şi recunoaşterea sa de către limfocitele T, deoarece administrarea ei după o oră de la contactul macrofagelor cu antigenul a rămas fără efect. Cloroquina a blocat prezentarea antigenului de către celulele dendritice, deşi ele nu sunt fagocitare *in*

vitro şi au un sistem lizosomal puţin dezvoltat. S-a dedus că ele prelucrează antigenul la suprafaţă, cu ajutorul ectoproteazelor de membrană, deşi nu există dovezi directe în acest sens.

Proteinazele cisteinice (fac parte din grupul enzimelor care funcţionează prin intermediari covalenţi enzimă–substrat) sunt importante în prelucrarea antigenelor, aşa cum au dovedit rezultatele experienţelor cu antigene sintetice. Proteoliza rapidă şi extensivă este cauza slabei imunogenităţi a unor antigene (sau chiar a absenţei imunogenităţii). Unele antigene sintetice (copolimerul L-acid glutamic-L-alanină) sunt mult mai imunogene după inhibarea acţiunii proteinazelor cisteinice.

Nu toate antigenele necesită proteoliza (fragmentarea) prealabilă recunoaşterii de către celulele T. Uneori denaturarea (deplierea) proteinelor este suficientă pentru ca antigenul să fie prezentat de CPA, chiar tratate cu cloroquină.

Antigenele peptidice mici (insulina, angiotensina) pot fi recunoscute în formă intactă (nativă) de unele subpopulaţii de limfocite T, în timp ce alte subpopulaţii recunosc formele prelucrate ale aceloraşi antigene.

Klein şi colab. (1985) afirmă că evenimentele prelucrării nu sunt esenţiale pentru ca antigenul să fie prezentat limfocitelor T. Totdeauna este însă necesară, conversia sa la o formă care să-i permită să interacţioneze cu moleculele CMH II ale CPA şi cu receptorii celulelor T. În acest scop s-au preparat liposomi cu molecule CMH II inserate în stratul lipidic, la care s-au cuplat covalent o varietate de antigene proteice. Liposomii cu complexele CMH II-antigen, legate la suprafaţă au stimulat clonele de limfocite T, *in vitro*, în absenţa completă a CPA.

Forma sub care limfocitele T recunosc antigenul depinde atât de natura CPA, dar în special de natura antigenului. Cele mai multe proteine solubile sunt rapid endocitate şi prelucrate, iar altele sunt legate de membrana celulei şi prezentate direct, fără o prelucrare prealabilă. Dimensiunea şi configuraţia moleculei de antigen sunt hotărâtoare în ceea ce priveşte gradul prelucrării sale, înainte de a fi prezentat. De regulă, moleculele mari necesită prelucrarea prealabilă, iar cele mici sunt prezentate în formă nativă. Forma chimică a antigenului, după prelucrare nu este cunoscută. Probabil este un polipeptid de dimensiuni mici.

Rolul moleculelor CMH în prezentarea şi recunoaşterea antigenului

Moleculele CMH sunt molecule de *recunoaştere* a antigenului şi au rol esenţial în declanşarea răspunsului imun. Răspunsul imun este rezultatul interacţiunilor complexe între celulele care prezintă antigenul şi limfocitele T şi B. Limfocitele T nu recunosc antigenul ca atare, ci numai după ce acesta a fost prelucrat şi prezentat pe suprafaţa unei celule. Antigenele sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH clasa I sau a II-a şi numai în această formă sunt recunoscute de limfocitele T.

Acest fapt a fost demonstrat de Zinckernagel şi Doherty (1974) în experienţe de genul următor:

– se inoculează şoareci ai liniei inbred D, cu suspensia virală A, pentru a stimula proliferarea limfocitelor T citotoxice (T_C), faţă de celulele infectate cu acest virus;

– culturile de fibroblaste de la embrionii liniilor D şi K se infectează cu virusul A;

– limfocitele T recoltate de la organisme ale liniei D, stimulate cu virusul A recunosc şi lizează *in vitro*, fibroblastele liniei D, infectate cu virusul A;

– limfocitele T_C nu recunosc şi nu lizează, *in vitro*, fibroblastele liniei D, infectate cu virusul B şi nici fibroblastele liniei K, infectate cu virusul A.

Concluzia este că recunoaşterea antigenelor sintetizate *în celule* este posibilă numai în cazul în care antigenele sunt prezentate în asociaţie cu determinanţii moleculari (moleculele CMH clasa I) ai suprafeţei celulelor infectate.

Recunoaşterea asociată a antigenului, cu moleculele CMH I sau II are două semnificaţii majore:

– celulele sistemului imunitar interacţionează cu proteinele proprii, numai în cazul în care acestea sunt asociate cu un determinant antigenic nonself, de origine virală, tumorală, sau indus de agenţi chimici;

– recunoaşterea antigenului este condiţionată de existenţa histocompatibilităţii, adică celulele care *prezintă antigenul* şi celulele care *îl recunosc* (limfocite T_C, T_H) trebuie să poarte pe suprafaţa lor molecule CMH I şi II identice. Celulele care interacţionează trebuie să aparţină aceluiaşi organism sau unor organisme identice genetic. Acesta este fenomenul de *restricţie* (limitare) a interacţiunilor celulare prin moleculele CMH (sau prin antigenele de histocompatibilitate).

Grefele de ţesuturi şi organe de la organisme diferite genetic sunt respinse rapid, deoarece antigenele CMH clasa I şi a II-a sunt antigene foarte puternice. La rândul lor, antigenele exogene, precum şi cele sintetizate în interiorul celulei (antigene virale, tumorale sau induse de agenţii chimici) sunt recunoscute de limfocite numai dacă sunt prezentate pe suprafaţa celulelor, în ambianţa moleculelor CMH.

Prezentarea antigenelor exogene şi activarea limfocitelor. Prezentarea antigenelor este o etapă obligatorie a elaborării răspunsului imun, care derivă din faptul că limfocitele T nu interacţionează direct cu antigenele. Capacitatea sistemului imunitar de a recunoaşte diversitatea structurilor antigenice din natură este funcţia unor molecule specializate ale suprafeţei limfocitelor (receptorii de antigen). Pentru a deveni disponibile interacţiunii cu receptorii specifici, epitopii antigenici sunt legaţi intracelular cu moleculele CMH I şi II şi sunt transportaţi la suprafaţa CPA, ca fragmente peptidice sau ca proteine intacte. Moleculele CMH I şi II au capacitatea de a lega şi de a expune pe suprafaţa celulei, un număr nelimitat de peptide diferite ca structură. Antigenele proteice solubile, antigemele bacteriene

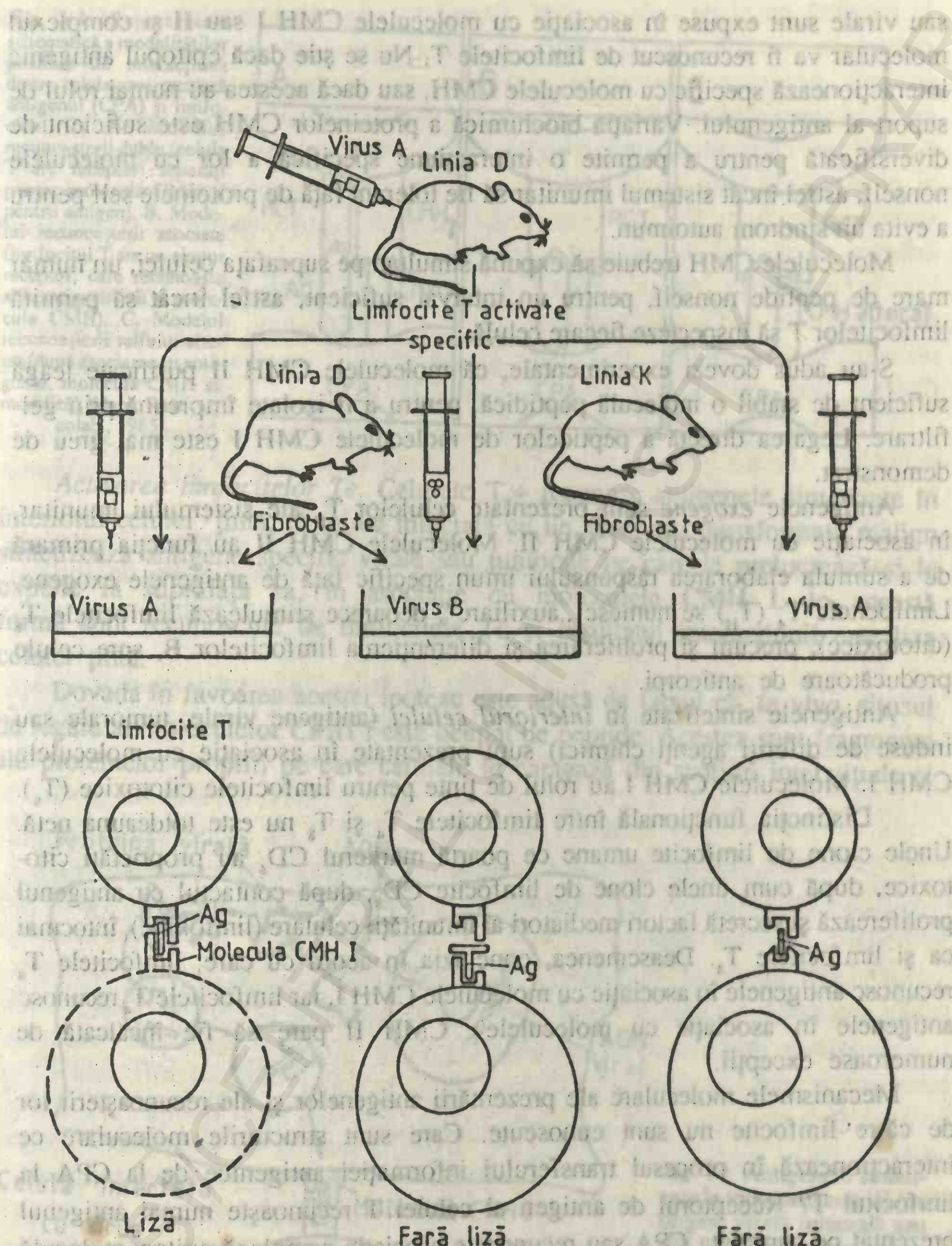


Fig. 42. Acţiunea limfocitelor T citotoxice (T_C) este restrictivă în raport cu moleculele CMH clasa I, deoarece celula T_C recunoaşte atât antigenul specific cât şi molecula CMH clasa I. Zinckernagel şi Doherty (1974) au infectat şoarecii liniei D (cu o anumită specificitate a moleculelor CMH), cu virusul liniei A şi au izolat limfocite T cu acţiune citotoxică specifică. *In vitro,* aceste limfocite vor liza fibroblastele embrionare de la organisme ale aceleiaşi linii (D), infectatę cu acelaşi virus (placa din stânga), dar nu vor liza celulele liniei D infectate cu virusul B (placa din mijloc), şi nici celulele liniei K (purtătoare ale unor molecule CMH cu specificitate diferită), infectate cu virusul A (placa din dreapta) după Grey şi colab., 1989)

sau virale sunt expuse în asociaţie cu moleculele CMH I sau II şi complexul molecular va fi recunoscut de limfocitele T. Nu se ştie dacă epitopul antigenic interacţionează specific cu moleculele CMH, sau dacă acestea au numai rolul de suport al antigenului. Variaţia biochimică a proteinelor CMH este suficient de diversificată pentru a permite o interacţiune specifică a lor cu moleculele nonself, astfel încât sistemul imunitar să fie tolerant faţă de proteinele self pentru a evita un sindrom autoimun.

Moleculele CMH trebuie să expună simultan pe suprafaţa celulei, un număr mare de peptide nonself, pentru un interval suficient, astfel încât să permită limfocitelor T să inspecteze fiecare celulă.

S-au adus dovezi experimentale, că moleculele CMH II purificate leagă suficient de stabil o moleculă peptidică, pentru a fi izolate împreună prin gel-filtrare. Legarea directă a peptidelor de moleculele CMH I este mai greu de demonstrat.

Antigenele *exogene* sunt prezentate celulelor T_{H} ale sistemului imunitar, în asociaţie cu moleculele CMH II. Moleculele CMH II au funcţia primară de a stimula elaborarea răspunsului imun specific faţă de antigenele exogene. Limfocitele T_4 (T_H) se numesc „auxiliare", deoarece stimulează limfocitele T_8 (citotoxice), precum şi proliferarea şi diferenţierea limfocitelor B, spre celule producătoare de anticorpi.

Antigenele sintetizate în *interiorul celulei* (antigene virale, tumorale sau induse de diferiţi agenţi chimici) sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH I. Moleculele CMH I au rolul de ţinte pentru limfocitele citotoxice (T_8).

Distincţia funcţională între limfocitele T_4 şi T_8 nu este totdeauna netă. Unele clone de limfocite umane ce poartă markerul CD_4 au proprietăţi citotoxice, după cum unele clone de limfocite CD_8, după contactul cu antigenul proliferează şi secretă factori mediatori ai imunităţii celulare (limfokine), întocmai ca şi limfocitele T_4. Deasemenea, concluzia în acord cu care; limfocitele T_8 recunosc antigenele în asociaţie cu moleculele CMH I, iar limfocitele T_4 recunosc antigenele în asociaţie cu moleculele CMH II pare să fie încălcată de numeroase excepţii.

Mecanismele moleculare ale prezentării antigenelor şi ale recunoaşterii lor de către limfocite nu sunt cunoscute. Care sunt structurile moleculare ce interacţionează în procesul transferului informaţiei antigenice de la CPA la limfocitul T? Receptorul de antigen al celulei T recunoaşte numai antigenul prezentat pe suprafaţa CPA sau recunoaşte asociaţia complexă epitop moleculă CMH? Molecula CMH leagă specific epitopul antigenic sau este numai un suport pentru acesta? Aceste întrebări, ca şi altele nu au primit răspunsuri satisfăcătoare.

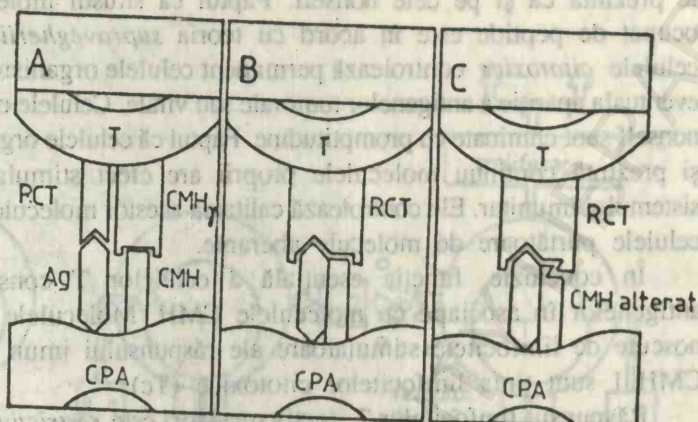


Fig. 43. Reprezentare schematică a modalităţilor posibile de interacţiune dintre celula care prezintă antigenul (CPA) şi limfocitul T. A. Modelul recunoaşterii duble (celula T are receptori separaţi pentru molecula CMH şi pentru antigen). B. Modelul recunoaşterii asociate (limfocitul T are un singur receptor, care recunoaşte atât antigenul cât şi molecula CMH). C. Modelul recunoaşterii selfului alterat (după asocierea cu antigenul, molecula CMH se modifică) (după Roitt şi colab., 1985).

Activarea limfocitelor Tc. Celulele T_8+ recunosc antigenele sintetizate în interiorul celulei ţintă. O celulă infectată cu un virus sau transformată malign sintetizează antigene specific virale sau tumorale pe care le prelucrează şi le expune la suprafaţa sa, în asociaţie cu moleculele CMH I. În această formă sunt recunoscute de limfocitele Tc şi rezultatul interacţiunii este liza celulei ţintă.

Dovada în favoarea acestei ipoteze este adusă de faptul că, *in vivo*, situsul de legare al moleculelor CMH I este ocupat de peptide. Acestea sunt fragmente ale proteinelor proprii, pe care celulele le captează din spaţiile interstiţiale şi

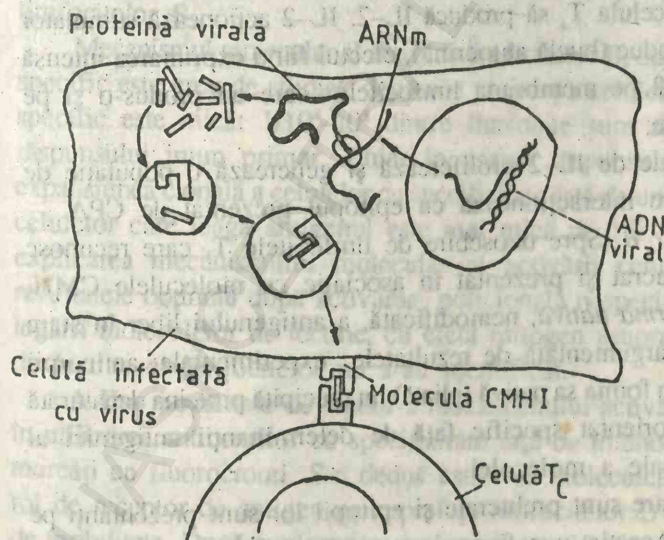


Fig. 44. Antigenele sintetizate în interiorul celulei (de origine virală tumorală sau sub acţiunea unor agenţi chimici) sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH I şi sunt recunoscute de limfocitele T_C (după Grey şi colab., 1989).

le prezintă ca şi pe cele nonself. Faptul că situsul moleculelor CMH I este ocupat de peptide este în acord cu teoria *supravegherii imune,* după care, celulele *citotoxice* controlează permanent celulele organismului pentru a detecta eventuala apariţie a antigenelor tumorale sau virale. Celulele care exprimă molecule nonself sunt eliminate cu promptitudine. Faptul că celulele organismului prelucrează şi prezintă continuu moleculele proprii are efect stimulator asupra celulelor sistemului imunitar. Ele controlează calitatea acestor molecule expuse şi detectează celulele purtătoare de molecule aberante.

În concluzie, funcţia esenţială a celulelor T constă în recunoaşterea antigenelor în asociaţie cu moleculele CMH. Moleculele CMH II sunt recunoscute de limfocitele stimulatoare ale răspunsului imun (T_4), iar moleculele CMH I sunt ţinta limfocitelor citotoxice (Tc).

Răspunsul limfocitelor T (activarea lor) este *restrictivă* în raport cu aceste molecule. Aceasta semnifică faptul că antigenul va fi detectat şi eliminat numai în contextul asocierii cu moleculele CMH.

Mecanismul molecular al *activării limfocitelor* nu este cunoscut. În general, activarea lor este consecinţa interacţiunii cu celula prezentatoare de antigen.

Activarea limfocitelor T_4 are loc după recunoaşterea epitopului specific prezentat de CPA şi decurge în 3 etape:

1) După legarea celulei T_4 de CPA, un factor neidentificat, cu originea posibilă în celula T_4 stimulează CPA să producă IL-1. Sinteza IL-1 ar putea fi declanşată de un semnal care ia naştere după interacţiunea CPA cu limfocitul T;

2) IL-1 stimulează celula T_4 să producă IL-2. IL-2 acţionează stimulator asupra celulelor care o produc (buclă autocrină), efectul fiind exprimarea intensă a receptorilor pentru IL-2 pe membrana limfocitelor care au produs-o şi pe limfocitele aceleiaşi clone;

3) Limfocitele activate de IL-2 proliferează şi generează o populaţie de celule imunoreactive, care interacţionează cu epitopul prezentat de CPA.

Activarea limfocitelor B. Spre deosebire de limfocitele T, care recunosc antigenul modificat, prelucrat şi prezentat în asociaţie cu moleculele CMH, limfocitele B recunosc *forma nativă,* nemodificată, a antigenului liber în stare solubilă. Afirmaţia este argumentată de rezultatele experimentale: anticorpii obţinuţi faţă de o proteină în forma sa nativă (pliată) nu precipită proteina denaturată şi scindată. RIMH este orientat specific faţă de determinanţii antigenici ai conformaţiei tridimensionale a moleculei.

Antigenele corpusculare sunt prelucrate şi epitopii lor sunt prezentanţi pe suprafaţa macrofagului. Aceştia vor fi recunoscuţi de limfocitele B şi T_H.

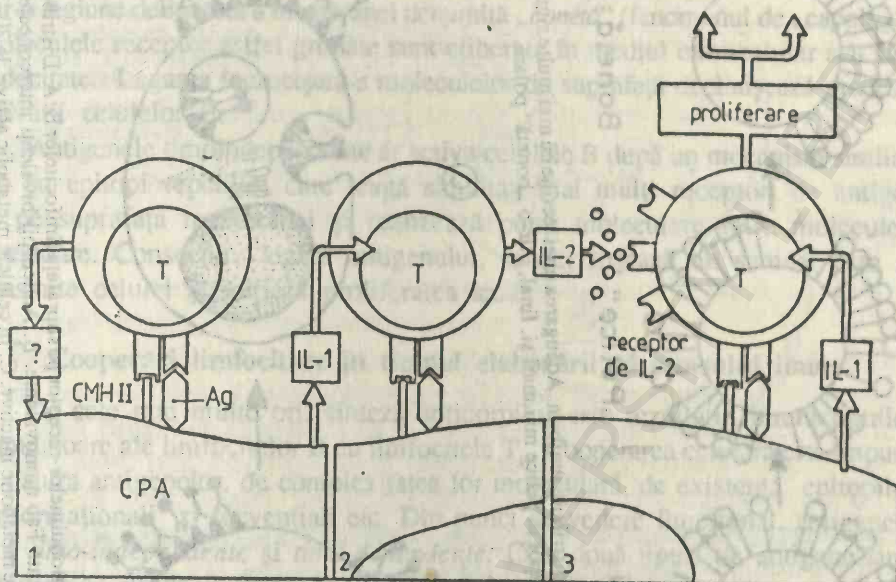


Fig. 45. Activarea limfocitelor T_H are loc în 3 etape. 1. După ce limfocitul T_H recunoaşte antigenul, CPA sintetizează IL–1. 2. IL–1 stimulează limfocitul T_H să sintetizeze IL–2. 3. Limfocitele T_H activate de IL–2 proliferează şi astfel are loc expansiunea lor clonală (după Roitt şi colab., 1985).

Ultimele sintetizează IL–2, cu efect stimulator asupra proliferării şi diferenţierii limfocitelor B.

Mecanismul molecular al activării limfocitelor B, după stimularea cu antigenul specific este greu de studiat, deoarece proporţia celulelor stimulate de antigenul specific este mică: $1/10^4$–10^5 dintre limfocite sunt stimulate pentru iniţierea răspunsului imun primar. Chiar în cursul răspunsului imun secundar, după expansiunea clonală a celulelor cu specificitate faţă de un anumit antigen, proporţia celulelor care leagă antigenul este mai mică de 1%. Din acest motiv, pentru explicarea mecanismului molecular al activării celulelor B s-au extrapolat rezultatele obţinute după activarea policlonală nespecifică, *in vitro* consecutivă legării moleculelor de lectine, cu efect mitogen asupra celulelor B. Receptorii de lectine ai limfocitelor nu s-au identificat.

A II-a modalitate de studiu a mecanismului activării celulelor B a constat în utilizarea anticorpilor cu specificitate faţă de imunoglobulina de membrană, marcaţi cu fluorocromi. S-a dedus astfel că moleculele de imunoglobulină cu rol de receptor de antigen pe suprafaţa limfocitelor B prezintă un grad ridicat de mobilitate. După cuplarea cu anticorpii specifici (sau cu antigenul bivalent),

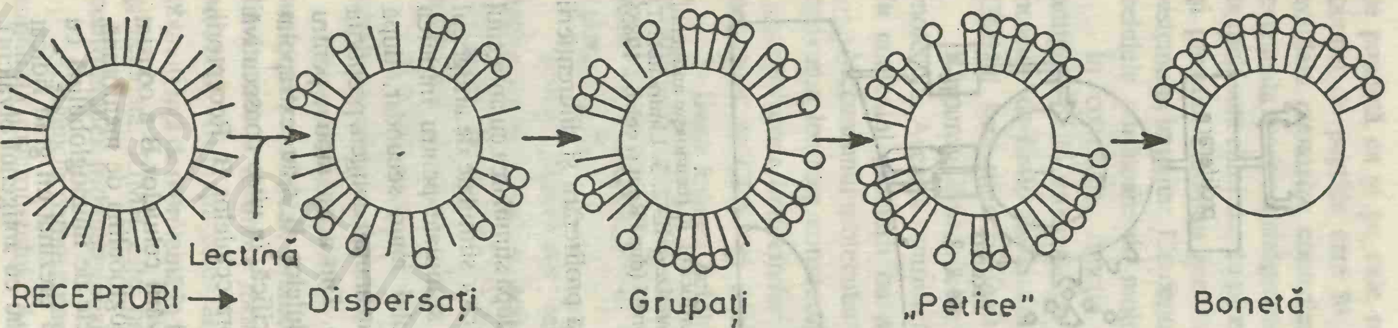


Fig. 46. Pe suprafața celulelor normale sau maligne, receptorii de lectine sunt distribuiți uniform. Adăugarea unei lectine cu mai multe situsuri de legare interconectează receptorii, agregându-i inițial în grupuri, apoi în petice mai mari și, final, într-o „bonetă" polară.

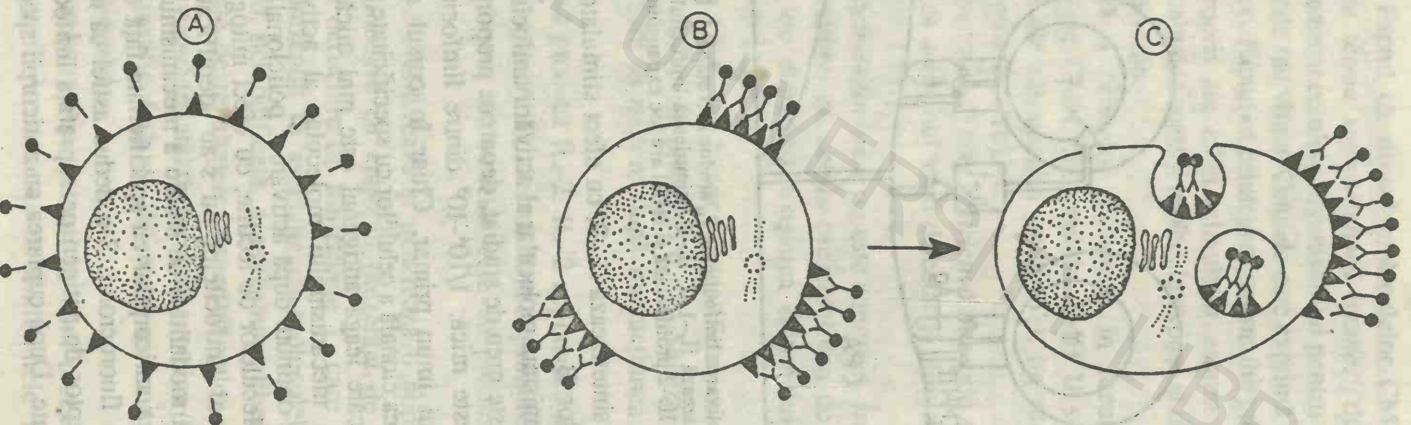


Fig. 47. Rolul anticorpilor bivalenți în inducția modificării distribuției imunoglobulinelor-receptor pe suprafața limfocitelor B. A. Distribuția uniformă a imunoglobulinelor-receptor, evidențiată prin marcare cu fragmente Fab monovalente. B. Anticorpii bivalenți interconectează moleculele de antigen (Ig-receptor) și le grupează în „petice", chiar în celulele metabolic inactive. C. În celulele metabolic active, la 20–37°, „peticele" se grupează și formează o „bonetă" polară, urmată de pinocitoză (după Raff, 1976).

moleculele receptor se grupează în zone discontinue („petice") şi ulterior confluează într-o regiune delimitată a membranei denumită „*bonetă*" (fenomenul de „capping"). Moleculele receptor astfel grupate sunt eliberate în mediul extracelular sau sunt endocitate. Legarea încrucişată a moleculelor de suprafaţă declanşează procesul activării celulelor B.

Antigenele timoindependente ar activa celulele B după un mecanism similar. Ele au epitopi repetitivi care leagă simultan mai mulţi receptori de antigen de pe suprafaţa membranei şi realizează punţi moleculare între moleculele receptoare. Consecutiv legării antigenului, se declanşează un semnal care se transmite celulei şi iniţiază proliferarea sa.

Cooperări limfocitare în timpul elaborării răspunsului imun

De cele mai multe ori, sinteza anticorpilor este rezultatul interacţiunilor stimulatoare ale limfocitelor B cu limfocitele T_H. Cooperarea celulară este impusă de natura antigenelor, de complexitatea lor moleculară, de existenţa epitopilor conformaţionali şi secvenţiali etc. Din punct de vedere funcţional, antigenele sunt *timo-independente* şi *timo-dependente*. Cele două tipuri de antigene sunt recunoscute, probabil, de subpopulaţii distincte de limfocite B, care se activează prin mecanisme moleculare diferite.

Antigenele *timo-independente* sunt molecule mari, neproteice (de exemplu, polizaharidul capsular de pneumococ, ficolul – polimer de sucroză, dextran-sulfatul, lipopolizaharidele bacteriilor Gram negative), cu epitopi repetitivi. Limfocitele B recunosc direct această categorie de antigene şi se activează, fără să necesite cooperarea limfocitelor T. Stimularea limfocitelor B pare a fi determinată de legarea multivalentă a acestor antigene, de moleculele de imunoglobulină

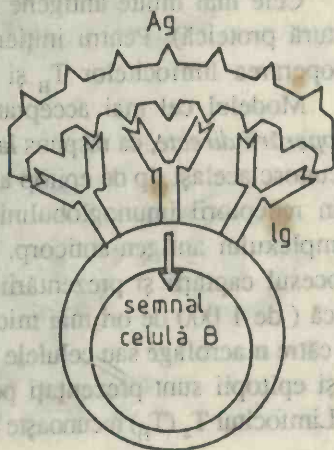


Fig. 48. Antigenele timo-independente stimulează direct limfocitele B, fără să necesite cooperarea celulelor T. Ele au epitopi repetitivi şi stabilesc punţi de legătură între receptorii imunoglobulinici. Se declanşează un semnal activator al proliferării şi diferenţierii limfocitelor B.

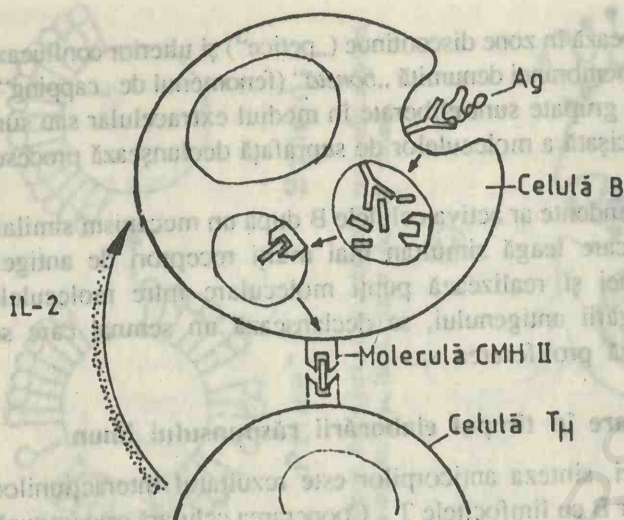


Fig. 49. Antigenele exogene solubile pot fi recunoscute şi prezentate de limfocitele B, în asociaţie cu moleculele CMH II. Limfocitul T_H avtivat specific sintetizează IL–2, cu efect stimulator asupra proliferării limfocitelor B.

de pe suprafaţa unei celule B. Legarea încrucişată a receptorilor şi formarea unor punţi intermoleculare declanşază *semnalul activator* care se transmite nucleului. Limfocitul proliferează şi se diferenţiază spre plasmocit. Antigenele polizaharidice activează şi alte clone celulare (activare *policlonală*), care nu au receptori specifici pentru epitopii lor.

Limfocitele T nu răspund la antigenele polizaharidice, deoarece acestea sunt molecule rezistente la procesele degradative (celulele nu au echipamentul enzimatic necesar). Fragmentele moleculare polizaharidice, eventual rezultate au afinitate mică faţă de proteine şi din această cauză nu se asociază cu moleculele CMH II.

Cele mai multe antigene solubile sunt *timodependente* (în special cele de natură proteică). Pentru iniţierea RIMH faţă de aceste antigene este necesară cooperarea limfocitelor T_H şi B, supusă restricţiei CMH.

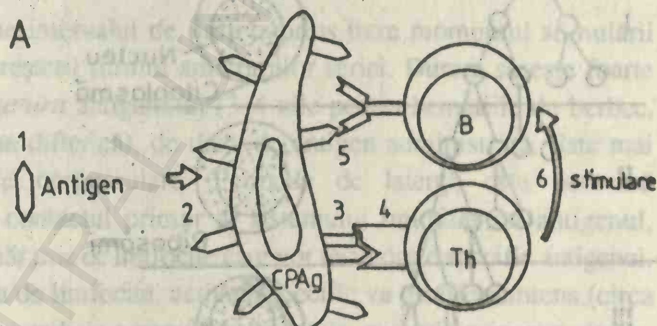
Modelul cel mai acceptat al cooperării limfocitelor T şi B este acela al *cooperării directe*, ca răspuns la antigene *solubile*, când ambele tipuri de limfocite recunosc acelaşi tip de epitop al unei molecule. Celula B leagă specific antigenul prin receptorii imunoglobulinici de membrană şi îl încorporează sub forma complexului antigen-anticorp. De aceea, limfocitele B sunt foarte eficiente în procesul captării şi prezentării unui antigen, administrat în concentraţie foarte mică (de 1 000 de ori mai mică decât cea necesară prezentării aceluiaşi antigen de către macrofage sau celulele dendritice). Antigenul este prelucrat de limficitele B şi epitopii sunt prezentaţi pe suprafaţa lor în asociaţie cu moleculele CMH II. Limfocitul T_4 (T_H) recunoaşte asociaţia moleculară epitop–CMH II, prin receptorul

său specific de antigen (RCT) şi eliberează IL-2, cu rol de semnal inductor al activării limfocitului B.

De cele mai multe ori, limfocitele T_4 şi B cooperante recunosc epitopi diferiţi ai aceleiaşi molecule de antigen solubil, *nativ*, neprelucrat de limfocitele B. Limfocitele B recunosc epitopi *conformaţionali* ai moleculei proteice, iar celulele T_H recunosc epitopi *secvenţiali*, de 10–20 aminoacizi. Cele două celule cooperante aderă una de alta. Celula T_H este stimulată să secrete IL-2, în spaţiul intercelular îngust, cu rol declanşator al activităţii limfocitului B.

Clona de limfocite B, cu receptori specifici pentru epitopii antigenici proliferează (fenomenul *expansiunii clonale*).

Existenţa factorului inductor (helper) eliberat de celulele T_H este dovedită experimental: celulele T_H sensibilizate, *in vivo*, faţă de un antigen şi limfocitele B ale unui organism singenic sunt plasate în compartimentele unei camere, despărţite printr-o membrană poroasă, care permite numai schimburi moleculare. Cel puţin în unele situaţii, limfocitele B se activează sub acţiunea factorilor sintetizaţi de celulele T_H, ce difuzează prin membrana poroasă separatoare.



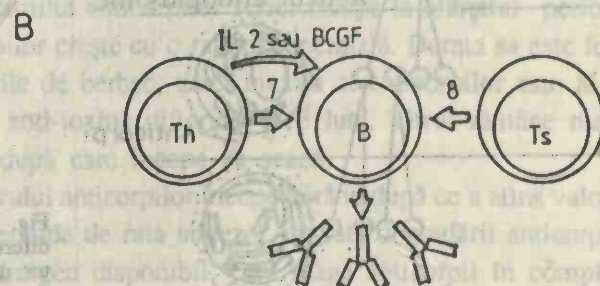


Fig. 50. A. Antigenele corpusculare sunt prelucrate de macrofage şi prezentate limfocitelor T_H şi B, care au receptori specifici. B. Cooperări celulare reglatoare între limfocitele B, T_H şi T_S (1-antigen; 2-epitopi antigenici liberi pe suprafaţa macrofagului; 3-epitopi prezentaţi în asociaţie cu moleculele CMH II; 4-receptorul de antigen al celulei T_H; 5-receptorul de antigen al celulei B; 7, 8-intensitatea răspunsului imun este reglată de limfocitele T_H şi T_S.

Limfocitele T_H şi B cooperează şi în cazul în care epitopii pe care-i recunosc sunt diferiţi şi sunt prezentaţi în asociaţie cu moleculele CMH II pe suprafaţa CPA. Majoritatea antigenelor *solubile* şi toate antigenele *corpusculare* sunt captate şi prelucrate de macrofage şi de celulele dendritice şi sunt prezentate în asociaţie cu moleculele CMH II.

Epitopii *identici* sau cu specificitate *diferită* sunt recunoscuţi de limfocitele B şi T_H, prin intermediul receptorilor de antigen. Celulele T_H eliberează cantităţi mari de limfokine (IL-2), cu efect stimulator asupra limfocitelor B. Ele se diferenţiază în limfoblaste şi plasmocite.

În ser, IgG este de 10 ori mai concentrat decât IgM, ceea ce denotă că, după activare, limfocitele B, deşi marea lor majoritate (circa 90%) au ca receptor de antigen molecula de IgM comută sinteza de IgM la sinteza IgG. Unele limfocite ale clonei B în expansiune sintetizează numai molecule de imunoglobulină care rămân asociate membranei citoplasmatice (mIg). În tehnica hemolizei localizate în gel a lui Jerne, aceste celule nu produc plaje de liză. Ele sunt celule *de memorie*.

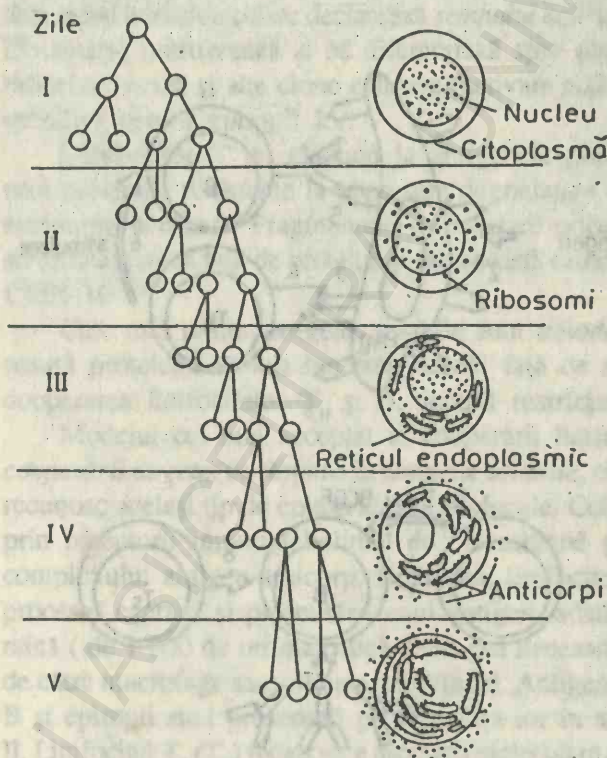


Fig. 51. Stadiile succesive ale diferenţierii unui plasmocit matur, după stimularea antigenică (după Nossal, 1969).

Serul normal prezintă o mare diversitate a imunoglobulinelor: circa 10^9 tipuri diferite ale specificităţii de combinare, cifră mult superioară numărului total al proteinelor structurale, enzimatice şi hormonale.

În serul normal, cantitatea totală de imunoglobuline este de 10 mg/ml (circa 5×10^{16} molecule). Înainte de imunizare, anticorpii serici specifici faţă de un antigen sunt sub nivelul detectabil prin metodele clasice.

Anticorpii îndeplinesc următoarele funcţii esenţiale:

– se combină specific cu antigenele solubile şi formează complexe, care sunt ingerate şi digerate de macrofage;

– fixează complementul pe suprafaţa unui antigen celular şi efectul este liza (bacterioliza, citoliza).

DINAMICA RĂSPUNSULUI IMUN MEDIAT HUMORAL

Răspunsul imun generat după primul contact al organismului cu antigenul se numeşte răspuns imun *primar*. În dinamica sa se disting 3 faze: 1) faza de *latenţă*; 2) faza de *creştere* a titrului anticorpilor; 3) faza de *scădere* a titrului anticorpilor serici.

Faza de latenţă este intervalul de timp cuprins între momentul stimulării antigenice şi începutul creşterii titrului anticorpilor serici. Durata sa este foarte variabilă, în funcţie de *natura* antigenului (3–4 zile pentru hematiile de berbec, 3 săptămâni pentru toxina difterică), de doza de antigen administrată. Este mai scurtă pentru antigenele corpusculare. Perioada de latenţă este necesară *expansiunii clonale*. La contactul primar al sistemului imunitar cu antigenul, în organism există un număr mic de limfocite care vor recunoaşte specific antigenul. În această perioadă, clona de limfocite, activată specific va prolifera intens (circa 8 generaţii de celule) şi va produce o populaţie de celule, numeric corespunzătoare reacţiei de apărare.

Faza de creştere a titrului anticorpilor serici începe la sfârşitul perioadei de latenţă. Titrul anticorpilor creşte cu o rată exponenţială. Durata sa este foarte variabilă: faţă de hematiile de berbec, titrul maxim al anticorpilor este la 4–5 zile, iar al anticorpilor anti-toxină difterică, la 3 luni. Titrul rămâne maxim (în platou) câteva zile, după care începe să scadă.

Faza de scădere a titrului anticorpilor începe curând după ce a atins valoarea maximă. Rata scăderii depinde de rata sintezei, de rata degradării anticorpilor, dar şi de cantitatea de antigen disponibil, care leagă anticorpii în complexe, determinând scăderea titrului lor. IgG se degradează în proporţie de 7%/zi,

IgA–25%/zi, iar IgM–18%/zi. La 30–40 de zile, titrul anticorpilor poate deveni nedectectabil.

În perioada de debut a răspunsului imun primar se sintetizează IgM. După 6–7 zile se detectează IgG, care atinge un titru mai înalt decât IgM. IgM începe să scadă mai înainte ca titrul IgG să atingă nivelul maxim.

Răspunsul imun are caracter adaptativ şi se caracterizează prin 3 trăsături esenţiale (care lipsesc reacţiilor de apărare înăscută): 1) *specificitatea* (anticorpii se combină cu antigenul inductor); 2) *diversitatea* izotipică şi a situsului de combinare; 3) *memoria* (experienţa contactului cu antigenul este păstrată de celule speciale).

Diversitatea. Moleculele de anticorpi sunt foarte heterogene din punctul de vedere al izotipului (IgM, IgG, IgA şi chiar IgE). IgM dispare relativ repede, dar IgG şi IgA persistă la concentraţii scăzute, nedectabile cu metodele obişnuite, perioade variabile (săptămâni, ani). Heterogenitatea anticorpilor generată de specificitatea lor de legare cu diferiţi epitopi ai antigenului inductor este mai accentuată şi este funcţia situsului de combinare.

Anticorpii răspunsului imun primar (IgM şi IgG), în general au *afinitate* slabă, dar *aviditatea* lor este mare.

Afinitatea anticorpilor măsoară forţa de legare dintre un epitop şi situsul de combinare al anticorpului specific. Afinitatea este rezultanta forţelor de atracţie (legături de H, forţe van der Waals, electrostatice şi legături hidrofobe) dintre cele două grupări reactante.

Aviditatea măsoară forţa rezultantă a afinităţii dintre epitopi şi paratopi şi este consecinţa faptului că cele mai multe antigene sunt mozaicuri de epitopi.

RĂSPUNSUL INUM SECUNDAR

Răspunsul imun secundar este expresia *memoriei imunologice,* care defineşte capacitatea unui organism de a elabora un răspuns imun mai eficient (mai *rapid* şi, în special, mai *intens*), după al II-lea contact cu antigenul. Răspunsul imun secundar este indus de antigenele *timodependente* şi are ca trăsătură *esenţială, maturarea de afinitate* a anticorpilor, comparativ cu afinitatea celor sintetizaţi în răspunsul imun primar.

Răspunsul imun secundar faţă de antigenele *timoindependente* este comparabil cu răspunsul imun primar: cantitatea de anticorpi nu creşte semnificativ, este sintetizat predominant izotipul IgM, nu se produce comutarea sintezei la anticorpi din clasa IgG, iar memoria imună este slab exprimată.

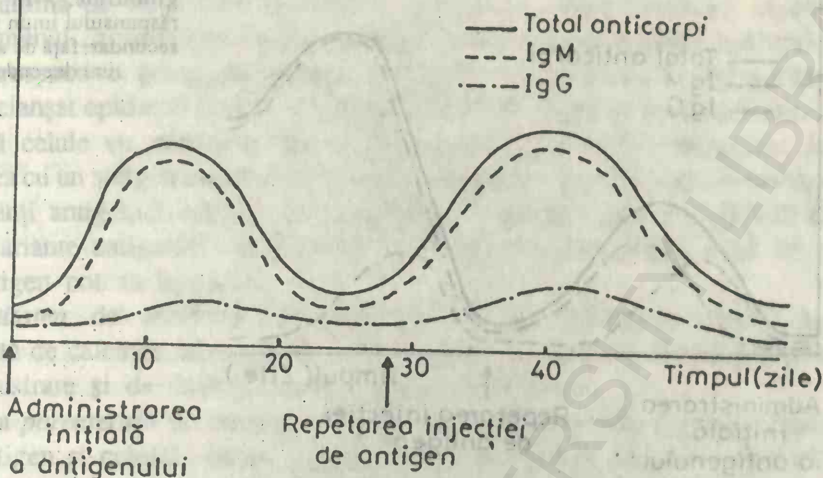


Fig. 52. Dinamica apariției diferitelor clase de imunoglobuline, în cursul răspunsului imun primar și secundar, față de antigenele timoindependente.

Răspunsul imun secundar față de antigenele timodependente se caracterizează printr-o perioadă de latență mai scurtă. Titrul anticorpilor crește rapid, cu un maxim mult mai ridicat decât în răspunsul imun primar.

Doza de antigen inductoare a răspunsului imun secundar este mult mai mică, iar timpul de dublare a titrului anticorpilor este de ordinul orelor. Inițial se sintetizează IgM, fără o perioadă de latență evidentă. Sinteza IgG este deasemenea accelerată. Titrul urcă la valori de câteva ori înalte decât în răspunsul imun primar și rămâne ridicat o perioadă mult mai lungă de timp.

Maturarea afinității anticorpilor în răspunsul imun secundar este o trăsătură esențială a răspunsului anamnestic. Fenomenul se explică prin faptul că, pe parcursul diferențierii proliferative a limfocitelor B, de regulă, se schimbă izotipul imunoglobulinelor de suprafață, prin comutarea tipului de lanț H pe care îl exprimă, dar niciodată nu se schimbă specificitatea față de antigen. Comutarea constă în trecerea de la sinteza IgM în răspunsul imun primar, la sinteza altor izotopuri (în special IgG) în răspunsul imun secundar. Mecanismul molecular al comutării îl constituie modalitatea diferită de înădire a ARNm a segmentelor genice, V, D, J, cu ARNm al uneia din cele câteva gene care codifică regiunile constante ale claselor și subclaselor lanțurilor H.

Sinteza anticorpilor cu afinitate înaltă are două consecințe practice:

– complexele antigen-anticorp sunt greu disociabile;

– anticorpii reacționează încrucișat, cu antigene înrudite. În acest sens, imunizările cu antigene înrudite (dar nu identice) pot avea efecte neașteptate. De exemplu, indivizii adulți vaccinați cu virus gripal, pot să producă, paradoxal,

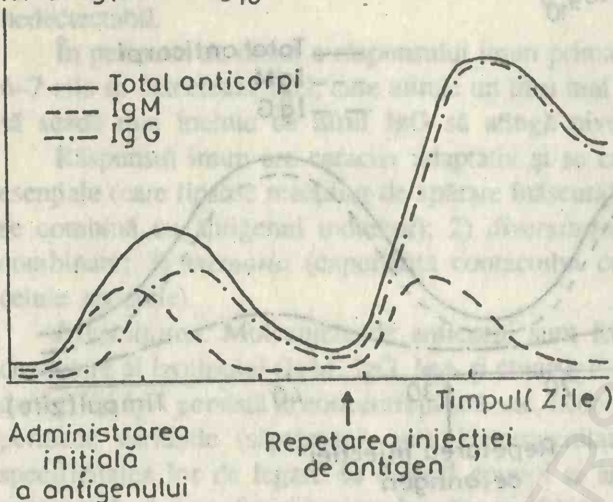


Fig. 53. Dinamica apariției diferitelor clase de imunoglobuline, în cursul răspunsului imun primar și secundar, față de antigene timodependente.

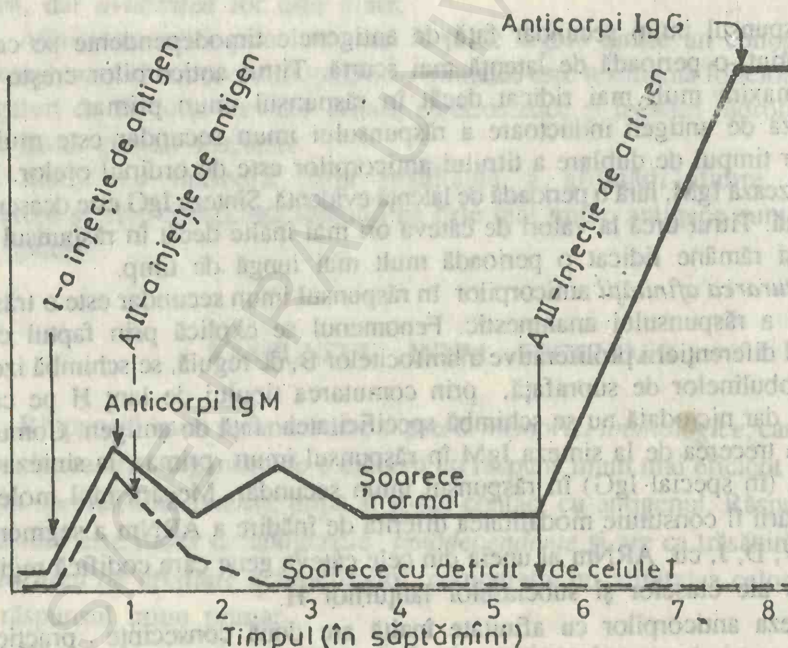


Fig. 54. Reprezentarea schematică a răspunsului imun la șoarecele normal, sau cu deficit al limfocitelor T, după injectarea unui antigen peptidic sintetic. Răspunsul imun primar (cu producere de IgM) este relativ independent de celulele T. Răspunsul imun secundar, caracterizat prin sinteza IgG este dependent de limfocitele T.

mai puţini anticorpi faţă de antigenul viral utilizat în vaccinare, decât anticorpi faţă de tulpina de virus care a produs o infecţie la vârsta copilăriei. Acesta este fenomenul „amintirii păcatului originar" şi stă la baza studiilor epidemiologice retrospective, pentru precizarea serotipului unui virus sau microorganism care a declanşat epidemii trecute. Explicaţia constă în faptul că prima imunizare generează celule cu memorie faţă de mai multe specificităţi antigenice. La reîntâlnirea cu un antigen înrudit este stimulată o populaţie de celule care recunoaşte determinanţi antigenici comuni. Se sintetizează anticorpi care se combină cu ambele variante antigenice, deşi uneori, anticorpii faţă de epitopii celui de la II-lea antigen pot să lipsească.

Cantitatea de anticorpi sintetizaţi în cursul răspunsului imun este dependentă de calea de administrare a antigenului, de doză, de ritmul şi modul de administrare şi de factorii genetici ai organismului.

Calea *parenterală* de administrare este avantajoasă pentru contactul rapid dintre antigen şi celulele imunocompetente din ganglionii limfatici regionali, după administrarea intradermică, subcutanată şi intramusculară, sau cu cele din splină, după injectarea *intravenoasă*. Răspunsul imun este de mică intensitate după injectarea intravenoasă, datorită eliminării rapide a antigenului. Injectarea *subcutanată* sau *intramusculară* este mai eficientă, deoarece eliminarea antigenului este mai lentă şi prelucrarea sa de către celulele specializate este mai îndelungată. Cea mai eficientă cale de administrare a antigenului este cea *intradermică*, pentru că persistenţa sa în depozitul iniţial este de lungă durată şi la locul injectării se acumulează celule implicate în elaborarea răspunsului imun. Există posibilitatea, chiar a producerii locale (in situ) a anticorpilor.

Intensitatea răspunsului imun este dependentă de legea *dozelor repetate* şi a *intervalelor*. Administrarea aceleiaşi doze de antigen, în mod fracţionat şi la intervale adecvate de timp este mult mai eficientă decât administrarea dozei unice, deoarece fiecare injecţie pregăteşte organismul făcându-l mai reactiv faţă de doza următoare.

Doza de antigen influenţează nivelul afinităţii anticorpilor. Dozele mari de antigen induc o maturare insuficientă a afinităţii, în raport cu dozele mici. Explicaţia: numai celulele B cu receptori de înaltă afinitate leagă antigenul în doză mică şi se diferenţiază proliferativ, în timp ce dozele mari de antigen produc o activare simultană a limfocitelor B de înaltă şi de joasă afinitate.

Pentru fiecare antigen se stabileşte *schema proprie* de administrare (doza, numărul de administrări, intervalul, calea de administrare, adjuvantul). Pentru antigenele corpusculare, administrările se fac, în general, la 7 zile, iar pentru cele solubile (macromoleculare), la 14–21 zile.

Uneori, a II-a injectare, foarte apropiată de prima, poate fi inoperantă, deoarece antigenul este eliminat de anticorpii sintetizaţi după stimularea primară. Unul din cele mai bune protocoale pentru a obţine un răspuns imun secundar optim constă în injectarea unei doze mici de antigen, urmată de doze progresiv crescânde.

Factorii genetici sunt esenţiali în ceea ce priveşte capacitatea de răspuns imun a organismului. Există posibilitatea ca organisme ale unor linii genetice diferite, sau ale unor specii diferite, să inducă sinteza anticorpilor faţă de epitopi diferiţi ai aceluiaşi antigen. Antigenele naturale conţin mozaicuri de epitopi şi organismele reacţionează la unii determinanţi, răspund mai greu sau îi ignoră pe alţii. Altcori, o substanţă poate să fie antigenică pentru unele specii, dar neantigenică pentru altele. De exemplu, polizaharidul capsular de pneumococ, înalt purificat este imunogen pentru om şi şoarece şi neimunogen pentru cobai şi iepure, care răspund numai după injectarea celulelor bacteriene întregi.

Deoarece o substanţă poate avea valoare antigenică diferită pentru indivizii aceleiaşi specii, serurile imune nu sunt reactivi standardizaţi.

Stimularea nespecifică a limfocitelor B. Proliferarea limfocitelor B este indusă nu numai de antigenul specific, ci de orice ligand care leagă încrucişat receptorii de antigen şi formează punţi intermoleculare. Legarea încrucişată a imunoglobulinelor de suprafaţă este semnalul pentru proliferare, dar nu şi pentru diferenţierea lor în plasmocite.

Stimularea limfocitelor B este, uneori, rezultatul activării receptorilor neimunoglobulinici de suprafaţă. Astfel, virusul Epstein–Barr şi endotoxinele bacteriilor Gram negative stimulează diviziunea *policlonală* a limfocitelor B şi diferenţierea lor la plasmocite. Semnificaţia fiziologică a activării *policlonale* nu este clară. Se secretă anticorpi a căror specificitate nu este totdeauna complementară agentului inductor. De exemplu, limfocitele B umane stimulate de virusul Epstein–Barr secretă anticorpi care se combină cu fosforil–colina, o moleculă absentă în structura virionilor, dar prezentă în peretele celular de *Streptococcus pneumoniae*. Activarea policlonală a limfocitelor B este importantă atât în fazele timpurii ale infecţiei, cât şi în inducerea variatelor fenomene autoimune.

Anticorpii naturali sunt cei cu specificitate faţă de antigene cunoscute, dar s-au sintetizat în afara oricărui proces de imunizare. De exemplu, în serul de şoarece există anticorpi anti–hematie de berbec. Sinteza anticorpilor naturali este consecinţa faptului că organismele, postnatal, sunt supuse stimulărilor antigenice multiple, cu antigene virale, bacteriene, fungice şi alimentare, care pătrund pe calea mucoaselor digestive şi respiratorii. Ele au rol stimulator asupra diferenţierii limfocitelor B din formaţiunile limfoide asociate tractului digestiv şi respirator. Deşi se sintetizează după stimulări cu doze antigenice mici, surprinzător, afinitatea

lor este inferioară celei a anticorpilor secretaţi după imunizare. Anticorpii naturali reacţionează cu mai multe antigene.

APLICAŢII PRACTICE ALE ANTICORPILOR

Cea mai largă utilizare (în perioada 1920–'40) a serurilor imune a constituit-o domeniul *seroterapiei* (terapia de urgenţă a unor infecţii grave septicemice, în infecţiile difterice, scarlatinoase, tetanice, rabice). Dezavantajul este că serurile imune conţin şi toate celelalte proteine serice, care sunt imunogene şi după injectare induc răspunsul imun al organismului receptor de ser, cu manifestări patologice (boala serului).

Anticorpii se folosesc într-o varietate largă de tehnici şi metodologii de diagnostic imunologic. Utilizarea lor depinde de posibilitatea de a-i produce pe iepure, capră, berbec, cal;

– în determinările fine a unor cantităţi mici de antigene (tehnicile ELISA, RIA);

– pentru purificarea proteinelor prin cromatografia de afinitate;

– pentru identificarea unor medicamente în ser şi urină;

– pentru detoxificarea organismului de droguri (eliminarea digoxinei, în cazul intoxicaţiei).

Biosinteza imunoglobulinelor

Sediul sintezei imunoglobulinelor este *plasmocitul*. Limfocitele sintetizează şi ele cantităţi minime de imunoglobuline, care rămân ancorate în membrana citoplasmatică şi au rolul de receptor de antigen. După activarea limfocitului, celulele descendente, rezultate printr-un proces de proliferare şi diferenţiere sintetizează cantităţi crescânde de imunoglobuline. Plasmocitul este celula cap de serie, diferenţiată terminal, care nu se divide şi trăieşte câteva zile. Ea sintetizează un singur de tip de imunoglobuline (circa 10000 de molecule/secundă).

Catenele polipeptidice H şi L se sintetizează separat, pe polisomi de dimensiuni diferite, ataşaţi pe reticulul endoplasmic granular. Mărimea polisomilor este proporţională cu lungimea lanţului polipeptidic pe care îl sintetizează şi este dependentă de lungimea moleculei de ARNm codificatoare. Catena L se sintetizează pe polisomi de 7–8 ribosomi, iar catena H pe polisomi de 14–16 ribosomi. Polisomii lungi, purificaţi, sunt precipitaţi, *in vitro*, de serul imun anti H.

Cele două catene se sintetizează ca precursori mai mari, cu o secvenţă N–terminală de circa 20 aminoacizi (secvenţa leader), clivată în timpul transferului în lumenul cisternei reticulului endoplasmic.

Cele două tipuri de catene se sintetizează ca unităţi de sine stătătoare şi ulterior se asamblează pentru a forma o structură tetracatenară.

Moleculele de imunoglobulină sintetizate se acumulează în cisternele reticulului endoplasmic granular şi sunt transferate în cisternele Golgi. La acest nivel are loc formarea legăturilor S–S şi glicozilarea. Compoziţia componentei glucidice este variabilă, dar ca structură de bază este reprezentată de N–acetil-glucozamină, manoză, galactoză, fucoză, acid sialic. Legarea primelor două monozaharide începe în momentul în care catena H este încă ataşată de polisom. Catena polizaharidică se alungeşte progresiv, pe măsură ce proteina se deplasează în cisternele Golgi. Moleculele de anticorpi părăsesc aparatul Golgi în vezicule secretorii, care fuzionează cu suprafaţa membranei şi eliberează conţinutul la exterior.

Legarea carbohidraţilor este indispensabilă pentru secreţia moleculei de imunoglobulină.

Moleculele de IgA şi IgM prezintă forme polimerizate. Asocierea monomerilor este catalizată de lanţul J. Polimerizarea are loc concomitent cu secreţia. În citoplasmă nu se găsesc molecule polimerizate.

REGLAREA SINTEZEI IMUNOGLOBULINELOR

În celulele care sintetizează imunoglobuline destinate secreţiei, catenele L se găsesc în mic exces. Pentru fiecare din cele două tipuri de catene, există un număr egal de molecule de ARN, dar catena L se sintetizează de două ori mai repede decât catena H, având dimensiuni mai mici.

În stările patologice, rata sintezei celor două catene este dezechilibrată: în mielomul Bence–Jones, catenele L se sintetizează în mare exces; în mielomul lanţurilor grele sunt produse exclusiv catene H, dar cu deleţii de mărime variabilă ale diferitelor domenii moleculare.

Reglarea sintezei anticorpilor este necunoscută. Sinteza anticorpilor IgM este inhibată de anticorpii IgG. Astfel este prevenită sinteza anticorpilor anti–Rh, prin administrarea IgG anti–D, persoanelor care prezintă riscul de a produce un nivel crescut de IgM anti Rh. Explicaţia inhibiţiei sintezei IgM prin IgG ar fi blocarea epitopilor antigenici, care nu ar mai fi astfel disponibili pentru a produce stimularea limfocitelor.

Rolul rețelei idiotipice în reglarea răspunsului imun. Răspunsul imun evoluează pe două direcții esențiale:

1) Sinteza anticorpilor complementari față de antigenul inductor, a căror acțiune este legarea și neutralizarea antigenului;

2) Sinteza unor molecule care se combină specific cu receptorii limfocitelor și îi blochează, inhibând funcția lor și stopând răspunsul imun. Aceste molecule au rol esențial în reglarea răspunsului imun.

Organizarea sistemului imunitar într-o rețea complexă de celule și molecule, aflate în interacțiuni strânse este esențială pentru înțelegerea orientării răspunsului imun, inițial în sensul eliminării antigenului, iar ulterior pentru limitarea răspunsului imun.

Factorul cheie al teoriei rețelei idiotipice este că anticorpii produși într-un răspuns imun poartă la rândul lor, determinanți antigenici noi, pe care organismul îi recunoaște ca nonself. Acești determinanți se numesc idiotopi și sunt localizați în jurul situsului de combinare al anticorpului. Setul de *idiotopi* al unei molecule individuale de anticorp formează *idiotipul* acelui anticorp.

Teoria *rețelei idiotipice* a lui Jerne pornește de la ideia că răspunsul imun față de un antigen se desfășoară în etape succesive. Faptul fundamental pentru această teorie este acela că organismul gazdă recunoaște ca străin idiotipul anticorpilor formați ca răspuns la pătrunderea unui antigen. Idiotopii prezenți pe anticorpii sintetizați în prima fază a unui răspuns imun se comportă ca antigene și declanșază un răspuns imun secundar, cu producerea de anticorpi anti–anticorpi din faza I a răspunsului imun. Anticorpii din faza a II-a se numesc anticorpi anti–idiotip. Dar și aceștia la rândul lor au un set de idiotopi proprii care se comportă ca antigene și induc sinteza anticorpilor din faza a III-a ș.a.m.d. Ca într-o sală de oglinzi, procesul de recunoaștere și sinteză se poate repeta continuu. Anticorpii produși într-o astfel de cascadă a răspunsului imun sunt legați într-o rețea de interacțiuni specifice care pot să implice întregul sistem imunitar. Anticorpii anti–idiotipici sunt forța reglatoare cheie a sistemului imunitar.

Anticorpii din prima undă au un situs de combinare complementar față de epitopul antigenic. Acești anticorpi sunt negativul epitopului și poartă imaginea sa internă. Anticorpii din faza a II-a (anticorpi anti–idiotip) au un situs de combinare identic cu epitopul antigenic și poartă imaginea externă a acestuia. Anticorpii din unda (generația) a III-a vor fi din nou negativul antigenului.

În acord cu această concepție, imunizarea declanșază o cascadă de procese de sinteză, în care moleculele idiotipurilor succesive se recunosc reciproc și funcționează ca ținte pentru semnalele de reglare.

După imunizare, are loc o creştere masivă a anticorpilor specifici în sânge şi, ca urmare, o creştere a idiotipurilor lor caracteristice. La rândul lor, aceste molecule idiotipice stimulează un răspuns anti–idiotipic, care limitează primul răspuns imun şi readuce sistemul imunitar la starea de echilibru.

CATABOLISMUL IMUNOGLOBULINELOR

Catabolismul imunoglobulinelor este studiat cu ajutorul moleculelor marcate cu I^{125} sau I^{131}. Primul are timp de înjumătăţire de 57 zile, iar al II-lea, de 8 zile. Iodul radioactiv este cuplat cu nucleul aromatic al tirozinei, sub acţiunea unor agenţi oxidanţi: H_2O_2, cloramina T, în condiţii blânde, care măresc şansa ca molecula de imunoglobulină marcată, să rămână identică din punct de vedere structural şi metabolic, cu cea nativă şi pe această cale să se aprecieze că scăderea radioactivităţii în sânge reflectă catabolizarea reală a proteinei. Catabolizarea imunoglobulinei este o reacţie de ordinul I, adică din molecula nativă rezultă produşi de catabolism.

Cantitatea de imunoglobulină catabolizată (dIg) într-un interval de timp dat (dt) este direct proporţională cu concentraţia moleculelor în sânge, conform relaţiei: $dIg/dt = kIg$ (k reprezintă rata catabolizării imunoglobulinelor, adică fracţia de molecule, din cea totală, catabolizată în unitatea de timp, de obicei în 24 ore).

Rata de catabolizare şi deci timpul de înjumătăţire al imunoglobulinelor sunt cu atât mai mari cu cât concentraţia lor este mai mare.

Pentru calculul ratei de catabolizare a imunoglobulinelor este suficient să se determine timpul de înjumătăţire a radioactivităţii. Prin această metodă, la un individ normal, timpul de înjumătăţire este de 22 zile.

Mecanismul catabolizării imunoglobulinelor. Prima ipoteză cu privire la mecanismul molecular al catabolizării afirmă că moleculele de imunoglobulină trec din spaţiul vascular într-un compartiment de „catabolizare", în care se găsesc celule capabile să le capteze prin pinocitoză. Deoarece aceste celule au număr limitat de receptori capabili să lege specific moleculele de imunoglobulină, în veziculele de micropinocitoză vor fi încorporate nu numai moleculele fixate pe receptori, ci şi molecule libere. Moleculele fixate pe receptori sunt protejate faţă de procesele degradative şi părăsesc celula, revenind în circulaţie, în timp ce moleculele care au fost pinocitate nespecific (fără legarea prealabilă de receptori) sunt degradate. Ipoteza explică dependenţa ratei de catabolizare a imunoglobulinelor, de concentraţie. La concentraţii serice scăzute, majoritatea moleculelor de imunoglobuline sunt înglobate în celule, după asocierea lor cu

receptorii protectori şi astfel se reîntorc intacte în circulaţie. Aşa se explică faptul că, în hipogamaglobulinemie, timpul de înjumătăţire este mare. La concentraţii ridicate de imunoglobuline serice (mielom), numai o proporţie mică de molecule (un număr egal cu numărul de receptori) este protejată, restul fiind degradate, ceea ce determină o scurtare a timpului de înjumătăţire. Ipoteza explică transportul placentar şi intestinal neonatal al IgG.

A II–a ipoteză sugerează că procesul catabolic este iniţiat numai după ce molecula de imunoglobulină a suferit o modificare conformaţională a regiunii Fc. Moleculele modificate, probabil prin uzură metabolică se fixează prin regiunea Fc de membrana leucocitelor PMN, a macrofagelor (în special hepatice şi splenice) şi sunt incorporate prin micropinocitoză. În vezicule are loc reducerea legăturilor S–S intercatenare şi hidroliza sub acţiunea enzimelor lizosomale. Această ipoteză, contrară celei de mai sus consideră că moleculele de imunoglobulină, odată fixate pe receptorii celulari sunt incorporate în celule şi degradate parţial sau total. Hotărâtor în procesul catabolizării imunoglobulinelor este tranziţia de conformaţie de la forma nativă la cea modificată. În sprijinul acestei ipoteze vin experienţele care atestă existenţa receptorilor pentru Fc de pe suprafaţa macrofagelor, capabili să fixeze numai moleculele care au suferit modificări ale regiunii Fc. Se pare însă, că receptorul celular implicat în catabolizarea imunoglobulinelor modificate este diferit de receptorul clasic pentru regiunea Fc a moleculelor intacte.

IMUNITATEA MEDIATĂ CELULAR

Răspunsul imun mediat celular s-a evidenţiat înainte de descoperirea diferenţelor funcţionale dintre limfocitele T şi B. S-a remarcat că unele antigene induc reacţii inflamatorii, a căror intensitate nu este corelată cu nivelul anticorpilor serici, iar reacţiile de hipersensibilitate întârziată, ca manifestare directă a răspunsului imun mediat celular pot fi produse la indivizi la care anticorpii lipsesc. Reactivitatea imună mediată celular este transferabilă cu limfocitele.

Imunitatea mediată celular îndeplineşte următoarele funcţii:

– protecţia faţă de infecţiile bacteriene cu localizare intracelulară, fungice, virale şi cu protozoare;

– rezistenţa faţă de multe tipuri de celule tumorale;

– procesele inflamatorii asociate cu diferite procese infecţioase;

– respingerea alogrefelor.

În toate aceste cazuri, reacţia imună mediată celular este consecutivă recunoaşterii unei structuri antigenice, pe suprafaţa unei celule ţintă, de către

limfocitul T CD_4+ sau T CD_8+. În general, limfocitele T CD_4+ recunosc antigenele solubile (fragmente peptidice), prezentate pe suprafaţa celulelor specializate, în asociaţie cu moleculele CMH II. Limfocitele T CD_4+ se activează (sub acţiunea IL-1 şi IL-6) şi secretă limfokine (interferon γ) prin intermediul cărora activează macrofagele, care la rândul lor sunt mediatorii principali ai reacţiei inflamatorii.

Limfocitele T CD_8+ recunosc antigenele prezentate pe suprafaţa celulelor ţintă, în asociaţie cu moleculele CMH I. Nu sunt activate de antigene solubile. Aceste limfocite sunt *citotoxice* (LCT). Au dimensiuni mici şi atacă celulele gazdă şi singeneice infectate cu virusuri sau malignizate (*in vivo* şi *in vitro*), dar şi transplantele alogenice sau xenogenice. *In vitro*, aceste celule au o mobilitate deosebită. La contactul cu o celulă străină, mobilitatea se accentuează şi întreaga suprafaţă a celulei ţintă este explorată, în câteva minute, pentru detectarea antigenelor pe care LCT le recunoaşte prin intermediul receptorului pentru antigen (RCT). Dacă antigenul este recunoscut, LCT se activează şi eliberează componente citotoxice. Apoi se deplasează mai departe, pentru a explora alte celule, iar celula victimă se dezintegrează câteva minute mai târziu. LCT repetă procesul lizei de mai multe ori. Procesul de recunoaştere a antigenului este limitat (restrictiv) de identitatea moleculelor CMH I.

În spaţiul îngust al joncţiunii cu celula ţintă, LCT elimină o proteină citolitică, denumită *perforină*, serin-proteaze, proteoglicani, limfotoxină. Proteina citolitică cauzează liza rapidă a celulei ţintă, iar proteinele citoxice acţionează lent.

LCT rezistă acţiunii litice a proteinelor proprii. Pentru liza unei celule ţintă, LCT eliberează circa 10% din conţinutul său toxic.

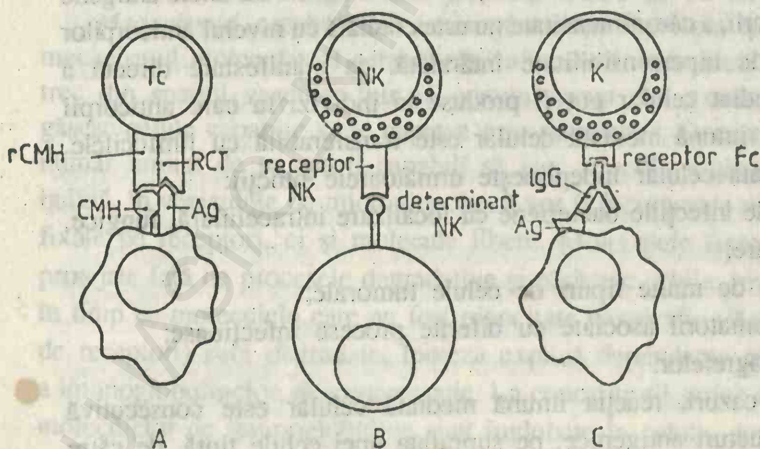


Fig. 55. Citotoxicitatea mediată celular, *in vivo* este consecinţa acţiunii a 3 tipuri de celule. A. Celulele T_c recunosc celula ţintă, prin determinaţii antigenici exprimaţi în asociaţie cu moleculele CMH I. B. Celulele NK recunosc determinanţi exprimaţi pe celulele maligne fără restricţia moleculelor CMH. C. Celulele K recunosc segmentul Fc al moleculelor de IgG, fixat pe determinanţii antigenici ai membranei celulei ţintă (după Roitt şi colab.1985).

LCT se evidenţiază *in vitro*, în reacţia limfocitară mixtă (RLM), uni- sau bidirecţională. Limfocitele organismului A se cultivă în amestec cu limfocitele organismului B, blocate metabolic (prin tratament cu mitomicină sau iradiere). Sunt păstrate proprietăţile stimulante, dar devin neproliferante. În 4–5 zile, limfocitele A, stimulate de limfocitele blocate, proliferează şi devin citotoxice.

În RLM bidirecţională, are loc activarea concomitentă a celor două populaţii de LCT. Raportul numeric este decisiv pentru evoluţia interacţiunilor. LCT victimă este supusă atacului concertat al câtorva LCT agresoare şi este lizată. Îndepărtarea ionilor de Ca^{2+} cu EDTA, din mediul de cultivare, previne liza celulei victimă. Probabil Ca^{2+} are rol esenţial în exocitoza şi în activarea perforinei.

Alte *celule citotoxice* sunt *limfocitele granulare mari* (LGL = *l*arge *g*ranular *l*ymphocytes), evidenţiate la om şi şoarece şi care reprezintă 5–10% dintre limfocitele circulante. Ele exercită efecte litice asupra celulelor purtătoare de antigene nonself, prin două mecanisme:

1) Celulele NK (*n*atural *k*iller) lizează spontan, *in vitro*, o varietate de celule tumorale, într-o interacţiune care nu este limitată (nerestrictivă) de recunoaşterea moleculelor CMH I. Imunizarea prealabilă a organismului, cu celulele ţintă sensibile nu ridică nivelul citotoxicităţii nerestrictive CMH şi de aceea se numesc *ucigaşe naturale*.

Interacţiunea cu celula ţintă se face printr-un receptor cu specificitate nedefinită al celului NK. Efectul litic este rezultatul acţiunii unui factor, pe care îl transferă în celula ţintă, prin contact celular direct. Granulele secretorii conţin componente citotoxice ca şi LCT.

Celulele NK pot avea rol important în rezistenţa naturală a organismului faţă de celulele tumorale şi în distrugerea celulelor infectate cu virusuri învelite, înainte de sinteza anticorpilor şi de activarea LCT.

Celulele K (*k*iller) sunt LGL care posedă receptori celulari de înaltă afinitate pentru Fcγ. Efectul lor litic asupra celulelor ţintă este rezultatul interacţiunii mediată de moleculele IgG. Celulele tumorale sau cele infectate cu virusuri leagă moleculele IgG de suprafaţa lor, expunând regiunea Fc. Aceasta funcţionează ca adaptor, permiţând celulei K, prin intermediul receptorilor pentru Fc, să recunoască şi să lizeze celulele învelite cu anticorpi. Liza celulei ţintă prin intermediul moleculelor de anticorpi, care au rolul de punţi moleculare între celula efectoare şi celula ţintă este cunoscută sub denumirea de *citotoxicitate mediată de anticorpi* (ADCC = *a*ntibody *d*ependent *c*ell *c*ytoxicity).

Pacienţii injectaţi cu AMC faţă de antigenele unor celule tumorale (melanom, limfom al celulelor B) evoluează favorabil: se produce distrugerea extensivă a celulelor tumorale, atât prin ADCC cât şi prin fixarea C.

O altă categorie de celule cu efect litic sunt cele activate, *in vitro*, de limfokine (LAK = *l*ymphokine *a*ctivated *k*iller).

Monocitele şi chiar unele PMN au activitate litică asupra celulelor purtătoare de antigene nonself.

Macrofagele activate şi monocitele sunt mai mari, exprimă mai intens moleculele CMH II, au lizosomi şi conţinut lizosomal mai bogat. Ele produc IL-1, TNF (*t*issue *n*ecrosis *f*actor), intermediari reactivi ai oxigenului, colagenază. Factorul de necroză tisular este o proteină citotoxică, cu efect lent (48–72 ore) asupra celulelor sensibile, foarte asemănătoare limfotoxinei produsă LCT activate. Ambele sunt proteine hidrofobe şi se leagă cu mare afinitate de aceiaşi receptori celulari.

Eozinofilele, în mod cert, au rol important în apărarea faţă de viermii paraziţi, prin efecte de citotoxicitate de tip ADCC.

Rolul IMC în apărarea antiinfecţioasă

IMC este foarte eficace în stoparea infecţiilor cu virusuri şi cu alţi agenţi patogeni care se multiplică intracelular. La copiii cu deficit de sinteză al anticorpilor, infecţiile virale comune (rujeolă, oreion) sunt limitate de IMC.

Liza celuleor infectate cu virusuri se produce înainte de eliberarea virusului matur, LCT oferind astfel un avantaj strategic al apărării, spre deosebire de anticorpi, care oferă un avantaj tactic, prin blocarea infecţiozităţii virionilor.

LCT oferă avantajul care derivă din natura antigenului pe care îl recunosc: antigenul nucleocapsidic, care nu diferă de la un serotip la altul. Anticorpii au spectru mai restrâns de acţiune, deoarece sunt specifici pentru una din variantele serotipice ale glicoproteinelor de înveliş.

IMC este principala modalitate de apărare faţă de microorganismele care se multiplică în celule. De exemplu, *L. monocytogenes* se multiplică în macrofage, pentru că sparge vacuola de fagocitoză. Trece de la o celulă la alta, fără să străbată spaţiul extracelular şi din această cauză anticorpii nu au efect protector. Limfocitele T CD_4+ recunosc antigenele de *Listeria* pe suprafaţa macrofagelor. Macrofagele sunt activate prin interacţiune directă, cu păstrarea restricţiei identităţii moleculelor CMH II şi astfel sunt distruse celulele de *Listeria*. Macrofagul activat poate să lizeze o varietate de microorganisme, celule tumorale, paraziţi extracelulari, indiferent de stimulul antigenic activator. Activarea macrofagului

este antigen-specifică (dependentă de celula T CD_4+), dar după activare macrofagul are activitate nespecifică.

Celulele infectate cu *Listeria* pot să fie lizate de LCT, probabil pentru că exprimă antigene de *Listeria* asociate cu moleculele CMH I. Celulele de *Listeria* eliberate nu pot fi distruse de LCT, ci de macrofagele activate.

MEDIATORII MOLECULARI AI REACTIVITĂŢII IMUNITARE

(Limfokine, Interleukine)

Răspunsul imun este controlat prin interacţiuni complexe ale diferitelor tipuri de celule şi de produsele de sinteză pe care acestea le secretă. Factorii solubili implicaţi în reglarea răspunsului imun au primit denumirea iniţială de *citokine*. Citokinele sunt un grup heterogen de molecule proteice a căror activitate se manifestă *in vivo* şi *in vitro*, la concentraţii foarte scăzute. Fiind foarte active la concentraţii foarte mici, au fost denumite *imunohormoni* (hormoni reglatori ai răspunsului imun), deoarece mecanismul lor de acţiune asupra celulelor ţintă este similar cu acela al hormonilor peptidici. Denumirea de „limfokine" derivă din faptul că sunt produse în primul rând de limfocite (pentru moleculele produse de monocite şi macrofage se foloseşte termenul de *monokine*), dar denumirea de *interleukine* (IL) este mai adecvată, întrucât reflectă rolul lor esenţial, acela de a media cooperarea celulelor sistemului imunitar.

Interleukinele sunt peptide hidrosolubile cu rol reglator, produse de limfocite şi de alte celule, al căror efect se exercită asupra limfocitelor.

Existenţa lor *in vivo* s-a recunoscut în 1967, când s-a remarcat că procesele inflamatorii sunt dependente de eliberarea factorilor solubili din celulele T activate şi din macrofage, care recrutează alte celule la locul inflamaţiei. Studiul lor a fost impus de faptul că rămăseseră neexplicate modalităţile în care o multitudine de celule neconectate anatomic îşi coordonează activitatea în direcţia unui răspuns selectiv faţă de un antigen. Modul de reglare a sistemului imunitar, misterios până la descoperirea interleukinelor este similar cu al reglării altor organe.

Producerea interleukinelor *in vivo* este dovedită de următoarele fapte:

1) Existenţa liniilor celulare limfoide a căror creştere *in vitro* este dependentă de IL. Aceste linii celulare se folosesc pentru testarea prezenţei IL într-un lichid biologic.

2) Existenţa clonelor de celule limfoide care produc cantităţi mari de IL după stimularea cu lectine. Aceste clone constituie o sursă de IL pentru analiza biochimică.

IL sunt produse *in vivo*, după activarea unor celule (limfocite T, monocite, macrofage etc) sub acțiunea antigenelor și a altor factori, *in vitro* în culturi limfocitare mixte, sau după stimularea nespecifică a limfocitelor cu substanțe mitogene (PHA, Con A).

IL își exercită efectul asupra celulelor sensibile după aceleași principii care guvernează acțiunea hormonilor propriu-ziși. Ele acționează direct asupra limfocitelor T, B și a macrofagelor și stimulează proliferarea și diferențierea lor spre celule efectoare: helper, citotoxice, producătoare de anticorpi sau modifică activitatea macrofagelor.

Producerea in *vitro* a IL s-a demonstrat în 1962, prin tehnica incubării celulelor exudatului peritoneal de șoarece în tuburi capilare, în ambianța materialului solubil eliberat de limfocitele sensibilizate după stimularea cu antigenul. Acest factor solubil produs de limfocitele stimulate s-a numit MIF (factorul inhibitor al migrării).

În funcție de efectul lor, limfokinele aparțin următoarelor grupe de activitate:

a) factori care modifică mobilitatea celulelor

b) factori care modifică proliferarea celulelor

c) factori stimulatori ai activității specifice a celulelor

d) factori care modifică viabilitatea celulelor.

IL-1 este produsă de celule din seria *monocit-macrofag*, dar și de keratinocitele tegumentare, de celulele endoteliale, gliale, dendritice și NK, sub acțiunea unor stimuli biologici (endotoxinele bacteriilor Gram-negative, exotoxinele și peretele celular al bacteriilor Gram pozitive, zimosanul din peretele levurilor, hemaglutininele unor virusuri, limfocitele T activate, complexe imune, C5a) și nebiologici (particule de siliciu, cristale de urați).

IL-1 este sintetizată ca o moleculă de 35 kD, după prelucrarea căreia rezultă o moleculă de 15 kD. Variantele moleculare de IL-1 (IL-1α, IL-1β) se explică prin existența unor factori genetici diferiți, sau a prelucrării diferite după traducerea informației genetice.

IL-1 acționează ca mesager cu spectru larg de acțiune;

– acționează direct asupra hepatocitelor și induce sinteza proteinelor de fază acută (proteina C reactivă), hipozincemie, hipofieremie și prin aceasta, inhibiția creșterii și diviziunii celulelor bacteriene;

– acționează direct asupra hipotalamusului prin stimularea sintezei prostaglandinelor (PG) și produce stare febrilă cu efect antiviral și antibacterian. De aceea, acțiunea monocitelor prin IL-1 asupra SNC poate avea consecințe importante, deoarece activitatea limfocitelor T este stimulată în stările febrile. Aspirina și indometacina blochează calea metabolică a acidului arachidonic, dar

inhibă şi activitatea IL-1 asupra hipotalamusului: deci efectele IL-1 sunt modulate de intermediarii căii metabolice a acidului arachidonic;

– asupra cortexului cerebral, IL-1 produce inhibiţie (somn) cu unde lente;

– stimulează producerea PGE_2 de către fibroblastele dermice şi inhibă sinteza colagenului;

– IL -1β este factorul de activare al osteoclastelor şi este implicată în procese patologice cu distrugere tisulară, în maladiile articulare (artrita reumatoidă);

IL-1β stimulează resorbţia osului şi cartilajului prin transformarea condrocitelor în condroclaste şi de aici derivă denumirea de *catabolină.*

Efectele IL-1 asupra sistemului imunitar:

– stimulează producerea IL-2 de către celulele T şi exprimarea receptorilor pentru IL-2

– este factor contrasupresor (inhibă activitatea celulelor Ts);

– stimulează proliferarea celulelor B după contactul lor cu antigenul;

– stimulează activitatea celulelor NK (exprimă permanent receptorul de IL-2;

– intensifică chimiotaxia macrofagelor şi stimulează producerea TNF (*t*umor *n*ecrosis *f*actor), stimulează producerea PGE_2. La rândul său PGE_2 inhibă producerea IL-1, diminuă exprimarea moleculelor CMH II, astfel încât IL-1 ar putea fi un factor de limitare a răspunsului imun;

– intensifică metabolismul oxidativ, capacitatea de fagocitoză, chimiotaxia, producerea de colagenază, stimulând astfel activitatea neutrofilelor.

Hormonii corticosteroizi (cu efect antiinflamator şi imunosupresor) blochează producerea IL-1.

IL-2 (denumirea veche, TCGF) (T *c*ell *g*rowth *f*actor) este principalul hormon implicat în generarea unui răspuns imun eficient. Par a fi 3 surse producătoare de Il-2:

– limfocitele din sângele periferic sau din organele limfoide (splină, tonsile) *in vitro*, după stimularea cu mitogene produc IL-2 detectabilă în supernatant după 72 ore de cultivare. Producţia se intensifică în reacţia limfocitară mixtă de la câţiva donori;

– liniile celulare T, *in vitro*, după stimulare cu PHA sau Con A;

– liniile celulare T, care produc IL-2 fără să necesite stimularea cu substanţe mitogene.

În absenţa IL-2 nu este posibil RIMC. IL-2 este principalul hormon reglator al răspunsului imun. Descoperirea sa a permis explicarea fenomenului expansiunii clonale, după următoarea secvenţă de evenimente:

– antigenul este înglobat, prelucrat şi prezentat de CPA (macrofage, celule B) unui număr mic de limfocite T care au receptori specifici şi îl recunosc;

– limfocitele T care au recunoscut antigenul, sub acţiunea stimulatoare a IL-1, devin producătoare de IL-2. IL-2 îşi exercită efectul stimulator asupra celulelor producătoare (buclă autocrină). Acestea răspund prin proliferare şi exprimarea intensă a receptorilor de IL-2 pe suprafaţa lor. Astfel se produce expansiunea clonei celulare care a recunoscut stimulul antigenic. IL-2 este produsă în câteva ore de la stimularea antigenică.

Clonarea genei pentru sinteza IL-2 a permis obţinerea unei cantităţi suficiente de IL-2 în stare cristalizată. Este o proteină de 15,4 kD şi conţine resturi de sialil şi glicozil.

Gena pentru sinteza receptorului IL-2 a fost deasemenea clonată. Receptorul IL-2 este format din două lanţuri proteice, unul de 55 kD, iar celălalt de 75kD. Receptorul are mare afinitate pentru IL-2. După stimularea antigenică primară receptorul de IL-2 este exprimat temporar. După a II-a expunere la antigen este exprimat permanent, cu o densitate înaltă. Rezultă că amplitudinea răspunsului imun este limitată de disponibilitatea receptorilor de IL-2. IL-2 este o moleculă efectoare nespecifică în privinţa originii sale dar acţiunea ei este

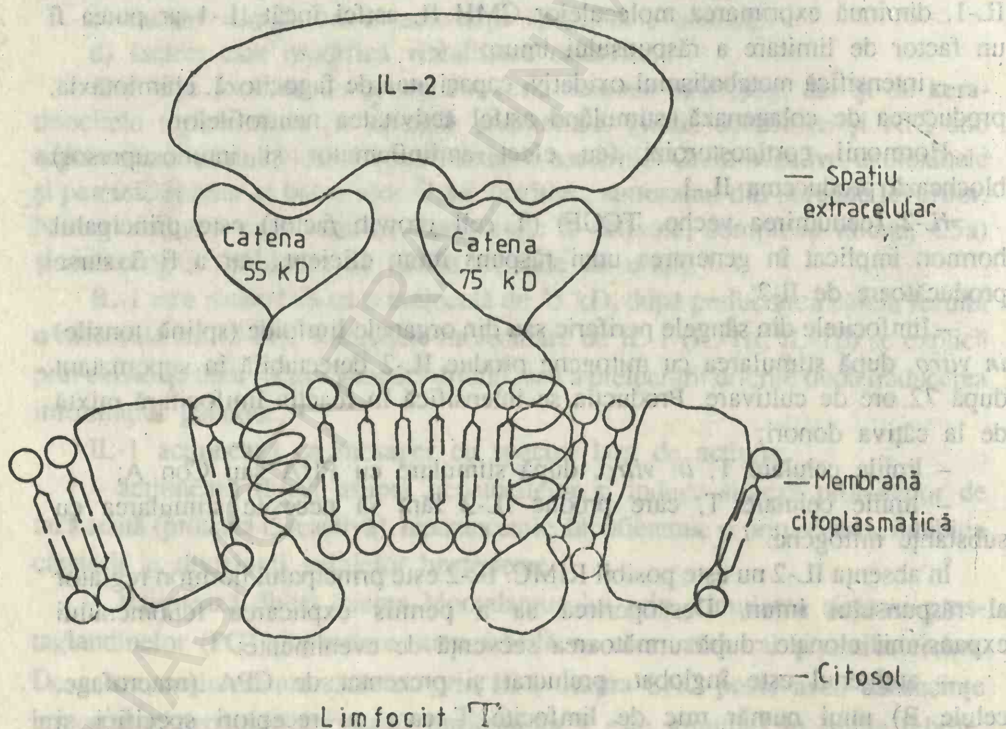


Fig. 56. Reprezentare schematică a interacţiunii IL-2, cu receptorul său membranar.

specifică pentru că produce expansiunea clonei care a recunoscut specific antigenul. Toate cele 3 seturi de celule (T_H, Tc, Ts) proliferează în prezența IL-2 şi îşi sintetizează receptori pentru IL-2.

Receptorul de IL-2 funcționează ca un întrerupător start-stop. IL-2 interacționează cu lanțul de 55 kD şi apoi se leagă cu proteina de 75 kD şi produce efectul activator. Interacțiunea este strânsă şi de aceea, disocierea este lentă. După disociere, activarea limfocitară încetează.

IL-2 joacă rol esențial în reglarea primelor evenimente ale răspunsului imun. IL-3 stimulează proliferarea şi maturarea mastocitelor.

IL-3, IL-4 şi IL-5 sunt secretate de limfocitele T_H-2 (cele care stimulează limfocitele B în elaborarea răspunsului imun), în timp ce limfocitele T_H-1 sintetizează IL-2. IL-4 şi IL-5 stimulează producerea de Ig E de 100–1000 de ori față de normal şi de IgG_4 de circa 20 de ori, în populațiile de celule B stimulate policlonal.

IL-5 stimulează sinteza IgA.

IL-6 este secretată de macrofage. La rândul ei, IL-6 stimulează hepatocitele să secrete o proteină care se leagă cu mare afinitate de resturile manoză ale polizaharidelor şi glicoproteinelor bacteriene.

Producerea şi activitatea interleukinelor pare a fi reglată de hormonii glucocorticoizi. Aceasta semnifică existența unei căi prin care activitatea sistemului imunitar se poate interconecta cu axa hipotalamo-hipofizaro-corticosuprarenaliană.

Limfotoxinele sunt produse de celulele limfoide şi macrofagele stimulate. Ele au efecte citotoxice sau citostatice pentru o varietate de tipuri celulare: celule neoplazice, sau infectate cu virusuri.

Limfotoxinele sunt produse de limfocitele citotoxice (T8⁺), de celulele NK şi K, de monocite şi PMN (eozinofile şi neutrofile).

Limfocitele Tc produc factorul *citotoxic*.

Macrofagele produc *TNF* sub acțiunea stimulatoare a IL-2 şi a interferonului γ.

După stimularea cu endotoxine, macrofagele produc o monokină de 17 kD, denumită *caşectină*, denumire dată după efectul său stimulator asupra catabolismului, ceea ce explică apariția şi manifestarea sindromului de epuizare (caşexia), caracterizată prin pierderea în greutate la pacienții cu unele infecții şi neoplazii. Caşectina inhibă transcrierea genelor care codifică enzimele lipogene.

Receptorii de caşectină se găsesc pe hepatocite, pe celulele musculare şi adipoase şi răspund prin intensificarea catabolismului. Trigliceridele sunt mobilizate din depozite şi creşte concentrația plasmatică a lipoproteinelor cu densitate foarte mică.

BAZELE CELULARE ŞI MOLECULARE ALE MEMORIEI IMUNOLOGICE

Memoria imunologică implică tipuri funcţionale specializate de limfocite T şi B, denumite celule „de memorie". Argumentul direct este însăşi timpul de latenţă mai scurt al răspunsului imun secundar, explicabil prin faptul că, după prima întâlnire cu antigenul se creează o populaţie mai numeroasă de celule specifice faţă de epitopii imunostimulatori. Aceste celule au parcurs deja câteva trepte ale diferenţierii spre celulele producătoare de anticorpi.

Receptorii de antigen ai celulelor B de memorie sunt molecule de IgG. După stimularea secundară, ele vor genera răspunsul imun secundar cu producerea de IgG. Pe suprafaţa altor limfocite B de memorie s-au identificat receptori ai altor izotipuri: IgM şi IgG, IgM şi IgA, IgM şi IgE. Aceşti markeri asigură generarea izotipurilor corespunzătoare de imunoglobuline, fiecare dintre ele având o eficienţă optimă ca mediatori ai funcţiilor efectoare particulare: IgA împiedică aderenţa microorganismelor patogene la suprafaţa mucoaselor, IgE activează mastocitele, iar IgM şi IgG sunt anticorpii efectori ai răspunsului imun humoral. Calea de administrare a antigenului influenţează profund izotipul de anticorpi care se sintetizează, ceea ce denotă faptul că celulele B de memorie au localizări specifice: celulele cu receptori IgA de suprafaţă, rămân localizate în structurile limfoide asociate mucoaselor (digestivă, respiratorie), iar cele cu receptori IgG se localizează în ganglioni.

Mecanismul generării limfocitelor B de memorie este controversat. Una din teorii consideră că precursorii celulelor plasmatice producătoare de anticorpi şi celulele B de memorie derivă din aceiaşi celulă B. Celulele rezultate din diviziunile succesive declanşate de stimularea antigenică evoluează diferit: unele se diferenţiază în *celule plasmatice*, iar altele rămân *limfocite mici*, care se întorc la starea G_0 şi devin *limfocite de memorie*.

O altă teorie consideră că plasmocitele şi limfocitele B de memorie provin din celule B diferite. Celulele imature (pre-B) ale unei clone sunt programate să devină celule de memorie sau celule plasmatice, înainte de stimularea antigenică.

Mecanismul păstrării pentru perioade îndelungate a memoriei imunologice (luni, ani, tot restul vieţii) nu este cunoscut. După unii autori, memoria este păstrată de limfocitele de memorie cu *viaţă lungă*, care rămân în stare de repaus, fără diviziune, pentru câteva zeci de ani. O altă ipoteză sugerează că antigenul, sub forma complexelor imune, rămâne pe celulele dendritice din foliculii ganglionari, perioade foarte îndelungate de timp, realizând *cicluri continue de activare* a limfocitelor B, la un nivel scăzut, deşi este greu de acceptat continuarea acestui

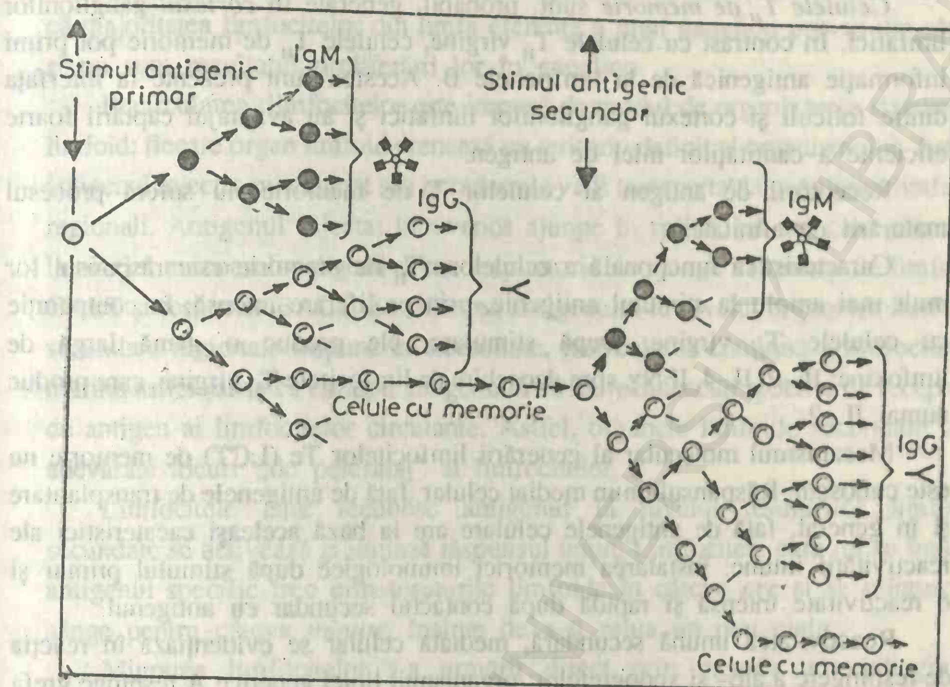


Fig. 57. Reprezentarea schematică a evenimentelor celulare care au loc în timpul elaborării răspunsului imun. Stimulul antigenic primar activează limfocitele B imunocompetente. Ele proliferează şi descendenţii lor se diferenţiază în celule anticorpo-formatoare, sau generează celule de memorie. Răspunsul imun secundar (după câteva luni sau ani) este mai rapid şi mai intens, datorită celulelor cu memorie, precodificat să răspundă la acelaşi antigen (după Relaval şi Rey, 1987).

proces timp de zeci de ani. O altă posibilitate ar fi ca memoria de durată să fie păstrată prin expunerea periodică a celulelor T şi B la *antigene cu reacţie încrucişată,* la superantigene sau mitogene, care determină o expansiune clonală limitată.

Cea mai argumentată pare a fi ipoteza limfocitelor B de memorie cu *viaţă lungă.* Expansiunea clonală a limfocitelor are loc în centrii germinativi ai ganglionilor limfatici şi splinei. Celulele B de memorie, cu viaţă lungă par să se întoarcă în măduva oaselor (un mediu foarte imunospresor). Semnalele care determină reintrarea acestor limfocite în circulaţie nu se cunosc, dar unul dintre ele ar putea fi chiar nivelul concentraţiei de antigen.

Limfocitele B de memorie nu se activează sub acţiunea mitogenilor sau a activatorilor policlonali, ci răspund numai la antigenul specific. Activarea lor necesită o cantitate mult mai mică de antigen şi este mult mai puţin T-dependentă.

Celulele T_H de memorie sunt, probabil, generate în *cortexul* ganglionilor limfatici. În contrast cu celulele T_H virgine, celulele T_H de memorie pot primi informaţie antigenică de la limfocitele B. Acestea sunt prezente la interfaţa dintre foliculi şi cortexul ganglionilor limfatici şi au avantajul captării foarte eficiente a cantităţilor mici de antigen.

Receptorii de antigen ai celulelor T de memorie nu suferă procesul maturării de afinitate.

Caracteristica funcţională a celulelor T_H de memorie este răspunsul lor mult mai amplu la stimulul antigenic, prin proliferare intensă, în comparaţie cu celulele T_H virgine. După stimulare, ele produc o gamă largă de limfokine: IL–2, IL-4, IFNγ, spre deosebire de limfocitele T_H virgine, care produc numai IL–2.

Mecanismul molecular al generării limfocitelor Tc (LCT) de memorie nu este cunoscut. Răspunsul imun mediat celular faţă de antigenele de transplantare şi în general, faţă de antigenele celulare are la bază aceleaşi cacateristici ale reactivităţii imune: instalarea memoriei imunologice după stimulul primar şi o reactivitate intensă şi rapidă după contactul secundar cu antigenul.

Reactivitatea imună secundară, mediată celular se evidenţiază în reacţia de respingere a alo– şi xenogrefelor: organismul liniei genetice A respinge grefa primară de ţesut de la linia genetică B, după tabloul respingerii primare (10–14 zile); a II-a grefă de ţesut de la linia B este respinsă rapid (5–6 zile); a II-a grefă de ţesut de la linia C este respinsă de organismul liniei A, după dinamica răspunsului imun primar.

RECIRCULAREA LIMFOCITELOR

Contactul antigenelor cu organele limfoide secundare, (suportul reacţiilor celulare ale răspunsului imun) impune, ca o condiţie funcţională esenţială, recircularea continuă a limfocitelor pentru a întâlni şi a recunoaşte antigenul. Din acest punct de vedere, limfocitele au o particularitate funcţională unică: părăsesc sângele (ca şi PMN) şi trec în organele limfoide secundare, dar se reîntorc în fluxul sanguin. Recircularea limfocitelor pe traseul sânge–ţesuturi limfoide–sânge se repetă de foarte multe ori şi este *independentă de stimularea antigenică.* Milioane de limfocite trec zilnic prin fiecare organ limfoid secundar, aşa încât fiecare antigen pătruns în organism va fi expus întregului repertoriu de receptori de antigene ai limfocitelor.

Recircularea limfocitelor a fost evidențiată de Gowans (1960). El a observat că majoritatea limfocitelor din limfa eferentă a unui ganglion provin din sânge și nu sunt rezultatul proliferării lor în ganglion.

Recircularea limfocitelor este impusă de modul de organizare a sistemului limfoid: fiecare organ limfoid drenează un teritoriu definit al organismului. Astfel, antigenul injectat subcutanat sau intradermic va fi transportat la ganglionii limfatici regionali. Antigenul injectat intravenos ajunge în splină, iar cel care pătrunde la nivelul mucoaselor digestivă sau respiratorie va ajunge în structurile limfoide GALT și respectiv BALT. Localizarea antigenului la nivelul organelor limfoide secundare regionale impune cu necesitate, recircularea continuă a limfocitelor, mărind astfel șansa ca epitopii antigenului să fie recunoscuți specific de receptorii de antigen ai limfocitelor circulante. Astfel, organele limfoide secundare sunt adevărate locuri „de pelerinaj" al limfocitelor.

Limfocitele care recunosc antigenul la nivelul țesuturilor limfoide secundare se activează și inițiază răspunsul imun. Limfocitele care nu au întâlnit antigenul specific trec prin țesuturile limfoide în câteva *ore* și se reîntorc în sânge pentru câteva *minute*, înainte de a-și relua un nou ciclu.

Migrarea limfocitelor s-a urmărit direct prin metoda autoradiografiei (limfocitele se recoltează și, *in vitro* incorporează markeri radioactivi sub forma cromatului de Na cu Cr^{51} sau a timidinei H^{3}). Mai recent marcarea celulelor s-a făcut cu compuși fluorescenți.

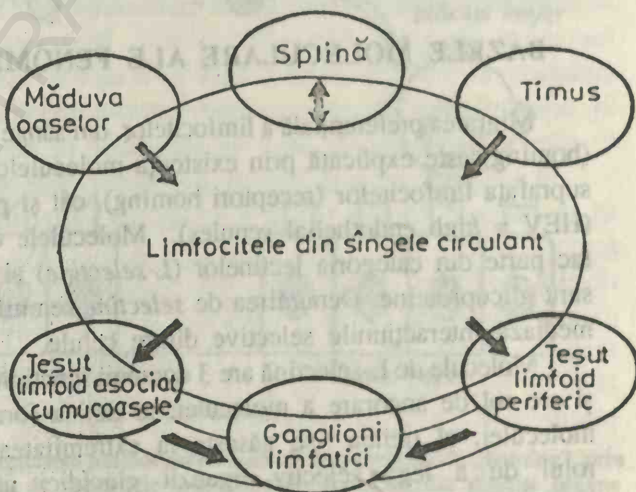


Fig.58. Căile majore de recirculare a limfocitelor. Limfocitele din sânge migrează în organele limfoide secundare (ganglioni limfatici, splină, plăci Peyer) prin cele mai multe țesuturi periferice, de unde sunt colectate de ganglionii limfatici regionali, prin limfaticele aferente. Limfocitele părăsesc gaglionii limfatici prin vasele limfatice eferente, pentru a reintra în circulație, pe calea canalului toracic (după Male și colab., 1987).

În ţesuturile nelimfoide, recircularea limfocitelor este mai puţin intensă, dar este foarte importantă pentru supravegherea imună. De exemplu, în creier, traficul limfocitar are valori scăzute comparativ cu acelea din ţesuturile limfoide, dar şi aici se declanşează un răspuns imun eficient faţă de celulele alogenice grefate.

Limfocitele circulante sunt celule competente (mature) T şi cele de memorie T şi B. Limfocitele B imunocompetente virgine (neangajate) au o perioadă de viaţă scurtă şi în mod obişnuit nu recirculă. Celulele B mature virgine, după maturarea în măduva osoasă intră în circuit în două situaţii: în primele zile ale răspunsului imun primar şi în cazul diminuării experimentale a celulelor B din circulaţie (prin tratamentul cu anticorpi anti IgM şi anti IgD).

Rutele de recirculare a limfocitelor nu sunt întâmplătoare. Deşi celulele T şi B intră în ţesuturile limfoide secundare în aceiaşi măsură, trecerea spre ţesuturile nelimfoide este realizată în primul rând de limfocitele T, aşa cum se evidenţiază prin determinarea numărului de celule T şi B în limfa din vasele eferente. Limfocitele T realizează controlul antigenelor de suprafaţă a celulelor din ţesuturi. În cazul în care celulele prezintă antigene nonself (virale, tumorale sau induse chimic), efectul este un răspuns imun citotoxic.

Recircularea limfocitelor arată o preferinţă evidentă pentru un anume tip de ţesut limfoid. Cele din ganglioni, la un viitor circuit se vor întoarce tot în ganglioni, iar cele din GALT vor urma traseul aceloraşi structuri limfoide. Aptitudinea remarcabilă a limfocitelor de a recunoaşte şi de a coloniza anumite ţesuturi limfoide a fost denumită de Sousa, *ecotaxis* (*homing*, *home*, *englez* = casă).

BAZELE MOLECULARE ALE FENOMENULUI DE HOMING

Migrarea preferenţială a limfocitelor, din sânge în ţesuturile limfoide specifice (homing) este explicată prin existenţa moleculelor cu rol de aderenţa, atât pe suprafaţa limfocitelor (receptori homing), cât şi pe venulele cu endoteliu înalt (HEV = *h*igh *e*ndothelial *v*enules). Moleculele cu rol de receptori specifici fac parte din categoria lectinelor (*L-selectine*) şi din punct de vedere chimic sunt glicoproteine. Denumirea de *selectine* semnifică faptul că aceste molecule mediază interacţiunile selective dintre celule.

Molecula de L-selectină are 3 domenii funcţionale: unul în membrana celulei şi are rol de ancorare a moleculei; al doilea formează cea mai mare parte a moleculei; al treilea se găseşte la extremitatea liberă a moleculei şi are rolul de a lega selectiv liganzii glucidici ai altei celule, în prezenţa ionilor de Ca^{2+}.

Specificitatea de homing a limfocitelor este dependentă de interacţiunea lor specifică cu HEV şi s-a studiat *în vitro* prin incubarea limfocitelor cu secţiuni subţiri de ţesut limfoid. S-a evidenţiat astfel că limfocitele recirculante se leagă specific de HEV şi nesemnificativ de endoteliul altor vase sanguine. Limfocitele B se leagă predominant de HEV din plăcile Peyer, iar limfocitele T se ataşează preferenţial de HEV din ganglionii limfatici. Aceste preferinţe de legare reflectă preferinţele de migrare ale limfocitelor: plăcile Peyer sunt relativ bogate în limfocite B, iar în ganglionii limfatici predomină limfocitele T.

Receptorii limfocitari se leagă specific cu moleculele complementare de aderenţă existente la nivelul HEV şi iniţiază evenimentele al căror rezultat este migrarea limfocitelor în ţesuturile limfoide. Trecerea limfocitelor din fluxul sanguin într-un organ limfoid secundar are loc în mai multe faze:

– legarea limfocitelor prin intermediul receptorilor de homing, la suprafaţa endoteliului venulelor post-capilare;

– deschiderea joncţiunilor strânse dintre celulele endoteliale (5–10 min);

– migrarea selectivă a limfocitelor T şi B, în ariile caracteristice, în orele următoare.

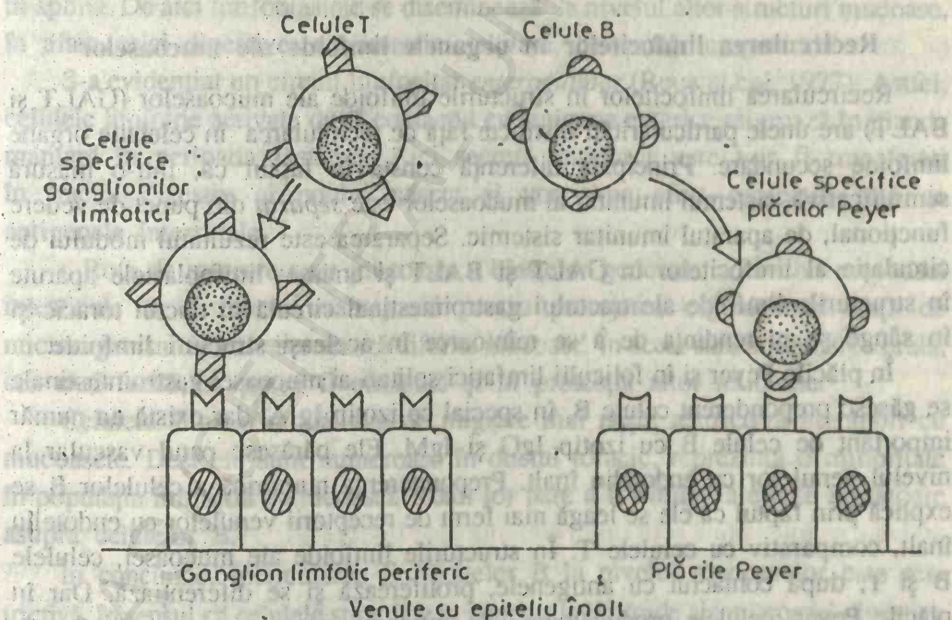


Fig. 59. Model ipotetic pentru explicarea bazelor moleculare ale fenomenului de „homing", prin interacţiunea selectinelor specifice de pe celulele endoteliale ale venulelor din diferite organe limfoide, cu receptorii de pe suprafaţa limfocitelor (după Male şi colab., 1987).

Fenomenul de *homing* este foarte important în procesul genezei embrionare a organelor limfoide primare, deoarece asigură migrarea în timus, respectiv în bursa lui Fabricius şi echivalenţii ei, a precursorilor limfocitelor T şi B (pre-B şi pre-T) precum şi revenirea limfocitelor în organul limfoid secundar respectiv, după ce au circulat în organism.

Astfel, limfocitele recoltate din ductul toracic migrează preferenţial în GALT, iar cele din ganglionii limfatici se reîntorc în ganglioni, în ariile timodependente, ca şi limfocitele recoltate din timus. Limfocitele T şi B splenice, după transferul în organismul receptor se distribuie în compartimentele corespunzătoare ale organelor limfoide secundare. Majoritatea limfocitelor din măduva osoasă migrează în regiunile timoindependente.

Ariile *timoindependente* ale organelor limfoide secundare sunt: foliculii cortexului extern din ganglionii limfatici, foliculii din plăcile Peyer, precum şi foliculii zonei periferice din pulpa albă a splinei.

Ariile *timodependente* sunt următoarele: cortexul profund al ganglionilor limfatici (paracortex), manşonul limfoid periarteriolar al pulpei albe splenice şi zonele interfoliculare ale plăcilor Peyer.

Ariile *mixte* sunt reprezentate de zona medulară a ganglionilor limfatici, zona marginală a pulpei albe şi pulpa roşie a splinei.

Recircularea limfocitelor în organele limfoide ale mucoaselor

Recircularea limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor (GALT şi BALT) are unele particularităţi distincte faţă de recircularea în celelalte organe limfoide secundare. Principala diferenţă constă în faptul că, într-o măsură semnificativă, sistemul imunitar al mucoaselor este *separat* din punct de vedere funcţional, de aparatul imunitar sistemic. Separarea este rezultatul modului de circulaţie al limfocitelor în GALT şi BALT şi anume: limfoblastele apărute în structurile limfoide ale tractului gastrointestinal circulă în ductul toracic şi în sânge şi au tendinţa de a se reîntoarce în aceleaşi structuri limfoide.

În plăcile Peyer şi în foliculii limfatici solitari ai mucoasei gastrointestinale se găsesc preponderent celule B, în special cu izotip Ig A, dar există un număr important de celule B cu izotip IgG şi IgM. Ele părăsesc patul vascular la nivelul venulelor cu endoteliu înalt. Preponderenţa numerică a celulelor B se explică prin faptul că ele se leagă mai ferm de receptorii venulelor cu endoteliu înalt, comparativ cu celulele T. În structurile limfoide ale mucoasei, celulele B şi T, după contactul cu antigenele, proliferează şi se diferenţiază. Dar în plăcile Peyer, celulele producătoare de anticorpi, practic nu există, deşi *in vitro* ţesutul limfoid al plăcii Peyer produce anticorpi. Acest fapt denotă că plăcile Peyer sunt structuri limfoide specializate în *medierea* contactului dintre

limfocite şi antigenele tractului intestinal, dar celulele B după stimulare migrează din plăcile Peyer, înainte de diferenţierea în plasmocite.

Celulele B stimulate (blaste) părăsesc structurile limfoide ale mucoasei prin vasele limfatice aferente ale intestinului şi pătrund în ganglionii mezenterici prin limfaticele lor aferente. Aici se pare că blastele dobândesc capacitatea de a migra selectiv în mucoasa digestivă şi respiratorie constituind ţesutul limfoid difuz. Din ganglionii mezenterici, celulele limfoide ajung în limfa ductului toracic. Receptorii de suprafaţă dobândiţi în ganglionii mezenterici favorizează tendinţa netă de recirculare a acestor limfoblaste în structurile limfoide în care au fost stimulate: cele din plăcile Peyer se vor întoarce în ţesutul limfoid al mucoasei tractului gastrointestinal, iar cele originare în ganglionii limfatici bronşici vor recircula tot în mucoase, dar mai ales în mucoasa respiratorie.

Una din explicaţiile fenomenului de recirculare a limfocitelor în structurile limfoide ale mucoaselor este că aceste situsuri sunt bogate în antigenele la care celulele au fost sensibilizate iniţial.

La nivelul mucoasei digestive, în plăcile Peyer, celulele B activate sintetizează în primul rând Ig A. De la locul activării, limfoblastele rezultate din profilerarea celulelor B migrează prin limfa eferentă şi ajung cu sângele în splină. De aici limfoblastele se disemineazā la nivelul altor structuri mucoase, în afara celei digestive: respiratorie, salivară, lacrimală, urogenitală.

S-a evidenţiat un circuit limfocitar *enteromamar* (Roux şi col. 1977). Astfel, celulele limfoide activate după contactul cu antigene enterice migrează în glanda mamară în perioada lactaţiei. Aici secretă anticorpi vare vor fi transferaţi în tractul digestiv al noului născut şi vor avea efect protector faţă de antigenele intestinale.

Ruta de migrare spre mucoase, a blastelor generate la nivelul mucoasei intestinale ar fi foarte avantajoasă pentru protejarea organismului faţă de microorganismele care invadează diferite mucoase. În acest caz, imunizarea orală, cea mai facilă, ar putea fi eficientă şi în protecţia altor mucoase.

Celulele T au o modalitate de migrare mai puţin restrictivă în raport cu mucoasele. Deşi ele sunt numeroase în ductul toracic, reprezintă o minoritate în populaţia limfoidă a mucoasei. Rolul lor pare a fi limitat la efecte reglatoare asupra celulelor B.

În concluzie, recircularea limfocitelor B la nivelul mucoaselor este restrictivă, în sensul că celulele stimulate în structurile limfoide ale mucoasei digestive au o tendinţă marcată de a recircula la nivelul altor mucoase. S-a avansat ipoteza unei specificităţi de organ a recirculării limfocitelor B. Cele activate (şi originare)

în BALT vor recircula în mucoasa respiratorie, iar cele activate (şi originare) în GALT vor recircula preferenţial la nivelul mucoasei digestive, asigurând astfel o eficienţă protectoare maximă.

EFECTUL STIMULĂRII ANTIGENICE ASUPRA ŢESUTULUI LIMFOID SECUNDAR

Antigenul injectat intravenos va fi captat preferenţial de macrofagele din zona marginală a splinei. Antigenele care străbat mucoasa intestinală sunt captate de celulele M ale plăcii Peyer şi de limfocitele din domul epitelial şi subepitelial, care le transportă până la limfocitele T şi B din ariile plăcii. Evenimente asemănătoare probabil au loc în ţesutul limfoid asociat bronhiilor. Antigenele injectate pe cale tegumentară sunt transportate în ganglionii limfatici locali, fie în stare liberă prin fluxul limfatic, fie legate de celule specializate (celulele *Langerhans* părăsesc epiderma prin vasele limfatice eferente, devin celule *voalate* şi după ce ajung în ganglionul limfatic migrează în aria celulelor T şi devin celule *interdigitate*). Rezerva de celule Langerhans o constituie, probabil, monocitul sanguin care trece din capilarele subepidermice, în epidermă.

Limfocitele mature recirculante vin în contact cu CPA, se activează şi formează *centrii germinativi*. Se disting 4 faze ale reacţiei într-un ganglion limfatic:

1) În primele ore după stimularea antigenică se produce o reacţie inflamatorie locală, cu o creştere a fluxului sanguin de circa 25 de ori. Se intensifică traficul limfocitar spre ganglion. Concomitent, pentru unele antigene, se produce obturarea ieşirii limfocitelor din ganglion, dar rata curgerii limfei nu se modifică. Sub acţiunea unor factori locali (prostaglandine, factori de aderenţă) se măreşte adezivitatea limfocitelor şi astfel în ganglion se formează un „dop" limfocitar.

2) După 1–2 zile se intensifică ieşirea limfocitelor ganglionare în fluxul limfatic eferent, în ganglion fiind reţinute cele care au interacţionat specific cu antigenul.

3) În cea de a 3-a şi a 4-a zi după stimularea antigenică, proliferarea limfocitelor activate se intensifică şi în limfa eferentă apar limfoblaste. Acestea au proprietăţi specifice de homing: se vor localiza tot în ganglioni şi în noile sedii se vor diferenţia în celule producătoare de anticorpi (plasmocite).

4) După cea de a 4-a zi diminuă generarea celulelor blaste. Se formează celule mici de memorie, care trec în sânge şi devin circulante.

Stimularea antigenică este însoţită de formarea centrilor germinativi. Numai antigenele timodependente induc formarea centrilor germinativi. În interiorul lor, celulele B proliferante se găsesc în asociaţie cu celulele Th.

TOLERANŢA IMUNITARĂ

Toleranţa este o stare caracterizată prin *absenţa răspunsului imun* faţă de un antigen. Starea de toleranţă este specifică pentru un antigen dat, deoarece este asociată cu păstrarea reactivităţii imune faţă de toate antigenele care nu dau reacţie încrucişată cu antigenul tolerat.

Toleranţa imunitară şi reactivitatea prezintă următoarele caracteristici comune:

– sunt specifice faţă de un anumit antigen;

– ambele stări se manifestă după contactul cu antigenul inductor;

– ambele fenomene sunt mediate de limfocite.

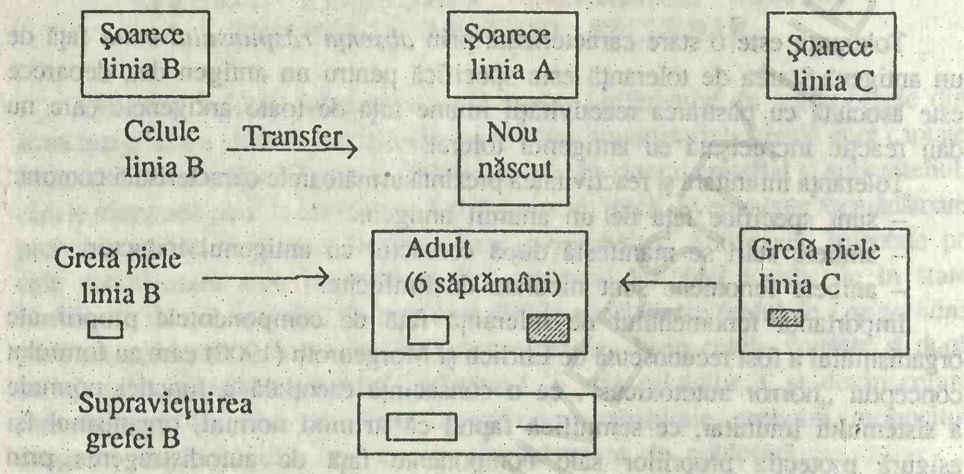
Importanţa fenomenului de toleranţă faţă de componentele proprii ale organismului a fost recunoscută de Ehrlich şi Morgenroth (1900) care au formulat conceptul „horror autotoxicus", ca o consecinţă esenţială a funcţiei normale a sistemului imunitar, ce semnifică faptul că în mod normal, organismul îşi asigură protecţia propriilor sale componente faţă de autodistrugerea prin reactivitate imunitară.

După 1920 s-a descoperit faptul că este posibilă inducerea toleranţei faţă de unele antigene exogene: de exemplu, *dozele mari de toxină difterică* suprimă răspunsul imun indus de dozele mici ale acestui antigen. Acelaşi lucru s-a remarcat în cazul *polizaharidului de pneumococ* şi a unui compus chimic simplu (neoarsfenamina) care funcţionează ca haptenă.

În 1945 s-a evidenţiat că *gemenii dizigoţi* de bovide (diferiţi din punct de vedere genetic) îşi tolerează reciproc antigenele tisulare, dacă în cursul vieţii embrionare, un proces de fuziune placentară a permis un schimb reciproc de elemente figurate. Cei doi gemeni resping grefele de ţesut provenite de la organisme cu ascendenţă comună. Aceşti gemeni sunt *himere hematopoetice* stabile. Fiecare dintre ei posedă elemente sanguine cu originea în cei doi embrioni diferiţi din punct de vedere genetic. Concluzia a fost că, *contactul timpuriu* (în viaţa embrionară) al celulelor sistemului imunitar cu antigenele creează o stare de toleranţă faţă de acestea şi sunt recunoscute ca self.

În anul 1959 s-a descoperit faptul că maturarea limfocitelor parcurge un stadiu în cursul căruia contactul cu antigenul perturbă acest proces, consecinţa fiind pierderea funcţiei imunitare, adică limfocitele devin tolerante faţă de antigenul respectiv.

Starea de toleranţă se poate induce experimental, la şoarecii nou născuţi, faţă de toate tipurile de antigene. Revelatoare în acest sens sunt stările de toleranţă faţă de celulele provenite de la organisme genetic diferite, transferate la animalele nou născute. Animalele injectate la naştere cu celule alogenice vor accepta, la vârsta adultă, grefele tisulare de la organismele donatoare de celule:



În stadiul embrionar şi o perioadă variabilă postnatală, în funcţie de specie, sistemul imunitar este *imatur* şi în consecinţă, foarte sensibil la inducerea stării de toleranţă imunitară.

Limfocitele B imature sunt foarte sensibile la inducerea stării de toleranţă, prin contactul lor cu antigenul, dar devin tot mai rezistente la acest proces pe măsură ce se maturează. Susceptibilitatea limfocitelor T faţă de inducerea toleranţei variază în limite mai restrânse, în cursul ontogeniei lor.

Mecanismele celulare şi moleculare ale inducerii sunt ipotetice, dar ţin seama de momentul inducerii toleranţei în cursul dezvoltării ontogenetice:

– după contactul primar cu antigenul, în cursul vieţii embrionare, ar avea loc *eliminarea clonei activate* de limfocite B, ceea ce implică pierderea definitivă a capacităţii de răspuns la stimulul antigenic respectiv;

– în cursul vieţii adulte, stimularea repetată cu un antigen timoindependent antrenează cu sine *epuizarea* limfocitelor antigen–reactive. Toate limfocitele B mature, capabile să reacţioneze specific la un antigen sunt stimulate şi se diferenţiază în celule producătoare de anticorpi, astfel încât o stimulare ulterioară cu acelaşi antigen rămâne fără răspuns. În cazul antigenelor timodependente, declanşarea răspunsului imun necesită un semnal cooperant al limfocitelor T_H. Dacă acest semnal lipseşte din diferite cauze, limfocitul B nu se activează şi se instalează toleranţa;

– deoarece starea de toleranţă a limfocitelor B mature este greu inductibilă, dar dozele mari de antigene greu degradabile sunt inductoare ale toleranţei, cantitatea de antigen în exces ar bloca receptorii de suprafaţă ai limfocitelor şi ar stopa diferenţierea lor spre celule producătoare de anticorpi;

– uneori starea de toleranţă, indusă de antigenele greu degradabile este *aparentă*, deoarece se sintetizează anticorpi specifici faţă de antigen. Se formează complexe imune care sunt fagocitate, dar antigenul nedegradat este eliberat şi leagă alte molecule de anticorpi. Deşi răspunsul imun există, în circulaţie nu se detectează anticorpi liberi;

– toleranţa imunitară poate fi mediată de celule Ts. Acest mecanism a fost demonstrat experimental la şoarece, după injectarea unei doze mari de hematii de berbec. Starea de toleranţă este transferabilă prin intermediul limfocitelor splenice Ts, la alte organisme izogenice;

– toleranţa indusă de factori blocaţi din ser, a căror natură, în general nu este cunoscută, deşi uneori s-au identificat a fi anticorpi. Acest mecanism pare a fi activ în cazul celulelor tumorale, care scapă acţiunii efectorilor. Factorii blocanţi maschează determinanţii antigenici ai celulei ţintă şi blochează astfel accesul efectorilor răspunsului imun (limfocite Tc şi K) la suprafaţa celulei maligne. Efectul este favorizarea (facilitarea) creşterii tumorii (tumour enhancement). Efecte similare se produc în cazul răspunsului imun faţă de unele bacterii patogene.

Factorii care condiţionează inducerea stării de toleranţă

Inducerea stării de toleranţă este dependentă de *doza de antigen* şi de *modul de administrare*. Dozele inductoare ale răspunsului imun şi ale toleranţei variază mult de la un antigen la altul, dar adesea, dozele foarte mici şi foarte mari induc starea de toleranţă, iar dozele medii sunt inductoare ale răspunsului imun. De exemplu, albumina serică bovină induce starea de toleranţă la doze mici (1 mg/kg, de 3 ori pe săptămână, timp de câteva săptămâni) sau la o doză mare (100 mg/kg). Administrarea antigenelor fără adjuvant favorizează instalarea toleranţei imunitare.

Pentru inducerea şi menţinerea stării de toleranţă este necesară *persistenţa antigenului*. Aşa se explică faptul că o doză unică a unui antigen care se catabolizează lent (polimer al D–aminoacizilor) induce o toleranţă mai îndelungată, în raport cu un antigen care se catabolizează rapid.

Calea de administrare a antigenului influenţează inducerea răspunsului imun sau a stării de toleranţă. Administrarea pe cale sanguină şi chiar orală favorizează inducerea toleranţei, iar administrarea subcutanată sau intramusculară facilitează declanşarea răspunsului imun.

Starea fizică a antigenului influenţează răspunsul organismului. Antigenele proteice în stare *agregată* sunt imunogene, iar forma monomerică (solubilă) a aceloraşi antigene este imunogenă sau tolerogenă, în funcţie de doză. Dozele mari de monomeri favorizează inducerea toleranţei, dar în asociaţie cu adjuvanţii sunt imunogene. Adjuvanţii favorizează agregarea monomerilor proteici, iar pe de altă parte formează un depozit tisular de antigen, de unde acesta este eliberat treptat.

Cea mai cunoscută stare de toleranţă experimentală, cu posibile corespondenţe clinice este cea indusă de dozele mari de polizaharide (antigene timoindependente, cu epitopi repetitivi). Ele produc paralizia limfocitelor B, după legarea în exces, de receptorii lor pentru antigen. Corespondentul clinic al acestei situaţii experimentale este starea de toleranţă indusă de microorganismele care produc pneumonii la persoanele în vârstă. Pe fondul reactivităţii imunitare scăzute, ţesutul pulmonar este inundat cu polizaharide capsulare bacteriene şi sfârşitul este letal.

Starea de toleranţă are specificitate, nu faţă de antigenul întreg, ci faţă de determinantul antigenic. Este posibilă toleranţa simultană faţă de mai multe antigene diferite, dacă toate au un determinant antigenic comun.

Durata stării de toleranţă este variabilă în funcţie de mecanismul celular care a mediat instalarea ei. Dacă toleranţa este indusă în cursul vieţii embrionare şi este rezultatul eliminării clonei de limfocite cu reactivitate specifică, toleranţa este *ireversibilă*. Toleranţa indusă după maturarea limfocitelor este o stare *reversibilă* şi revenirea la starea imunoreactivă normală este dependentă de timpul necesar *regenerării limfocitelor mature*. Dacă starea de toleranţă se datorează blocării celulelor producătoare de anticorpi (cea indusă de dozele mari de polizaharide), restabilirea reactivităţii imunitare depinde de *rata eliminării* antigenului. Transferul celulelor tolerante în mediu fără antigen este însoţit de pierderea rapidă a toleranţei.

TOLERANŢA FĂTULUI

Pentru organismul matern, fătul este o *alogrefă*, deoarece jumătate din zestrea sa genetică este de origine paternă. Lipsa reactivităţii imunitare materne este greu explicabilă.

Din punct de vedere imunologic, organismul matern nu este tolerant în raport cu fătul, deoarece grefa de țesut fetal este respinsă. Organismul matern își păstrează capacitatea normală de reactivitate imunitară, dar fătul, prin intermediul placentei dispune de un sistem de protecție eficient.

Pentru a explica mecanismele protecției imunologice a fătului s-au emis mai multe ipoteze:

– *uterul* este un organ privilegiat din punct de vedere imunologic, așa cum este camera anterioară a ochiului, testiculul, bariera meningeală. În realitate, uterul nu pare a fi un organ privilegiat, deoarece sarcinile extrauterine eșuează din alte motive decât cele ale reactivității imunitare. Dacă uterul ar conferi o stare de protecție imunitară, embrionii ar trebui să se dezvolte la gazde din alte specii, ceea ce nu se întâmplă;

– *placenta* – anexă de origine embrionară – este o barieră neutră între organismul matern și făt. Pe fața sa internă (spre embrion), placenta nu exprimă antigenele majore de histocompatibilitate, în timp ce pe fața externă predomină antigenele minore, dar se găsesc și antigene majore. Se găsesc deasemenea antigene de origine paternă, potențial capabile să inducă un răspuns imun al organismului matern;

– organismul matern exercită un *efect imunosupresor* prin intermediul unor hormoni și factori proteici care cresc cantitativ în cursul sarcinii și ar diminua reactivitatea imunitară: progesterona, hormonul coriogonadotropic, α – fetoproteina.

Organismul matern recunoaște antigenele fetale placentare și reacționează față de ele, deoarece în circulația maternă se găsesc anticorpi antifetali la circa 15% dintre gravide. Diferențele antigenice dintre mamă și făt par a fi chiar benefice pentru dezvoltarea fătului. Așa se explică vigoarea hibrizilor, în contrast cu dificultățile de propagare a liniilor inbred. Reactivitatea imunitară maternă este favorabilă dezvoltării fătului. Greutatea placentei și a embrionului este mai mare la femelele alogenice față de cele singenice în raport cu fătul lor.

Modelarea reactivității imunitare a organismului matern, astfel încât este favorizată toleranța fătului are loc nivelul *placentei*, ca zonă de interfață feto-maternă.

La nivelul placentei sunt concentrate substanțe cu acțiune imunosupresoare strict localizată. Tot aici acționează factori placentari care blochează diferențierea limfocitelor citotoxice și ucigașe (Tc și K). În placentă s-au detectat limfocite granulare cu efect imunosupresor, iar numărul lor crește semnificativ în a II-a jumătate a sarcinii.

Un alt mecanism prin care placenta își exercită rolul protector este rezistența deosebită a celulelor sale la efectul litic al celulelor ucigașe. Pe de altă parte,

placenta eliberează substanțe care neutralizează local orice anticorp antiplacentă şi îi transformă în anticorpi „blocanți" care la rândul lor au efect protector.

Placenta are o capacitate de reacție proprie. Eventualele sale distrugeri celulare provocate de efectorii imunității celulare şi humorale sunt compensate prin proliferarea celulelor rezistente. Placenta supusă atacului acestor efectori, la sfârşitul gestației este mai groasă decât cea normală.

Placenta are rolul de a minimaliza recunoaşterea fătului de către organismul matern. Sub aspect imunitar, placenta este o „zonă neutră" datorită nivelului scăzut al moleculelor CMH. Dacă efectorii celulari ai imunității reuşesc să se infiltreze, acțiunea lor este anulată de absența țintelor de atac.

O ultimă linie de apărare este sângele fetal al cordonului ombilical, care conține densități mari de celule imunosupresoare.

Dacă aceste bariere de apărare sunt depăşite se produce avortul imunitar.

Capitolul VI

CONFLICTUL GAZDĂ-MICROORGANISME PATOGENE

În timpul dezvoltării embrionare, fătul este scăldat în lichidul amniotic steril. Odată cu expulzarea sa începe colonizarea cu un număr mare de microorganisme nepatogene, comensale, care trăiesc în diferite nişe ecologice ale gazdei, fără să determine starea de îmbolnăvire. Astfel, tegumentul, cavităţile tractului digestiv şi respirator se populează cu microorganisme care realizează populaţii cu o densitate foarte mare de *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Candida* etc. Ele constituie *microbiota*, formată din subpopulaţii stabile şi echilibrate numeric, caracteristice stărilor de *eubioză*. În anumite situaţii particulare (regim alimentar dezechilibrat, tratament cu antibiotice cu spectru larg de acţiune), însoţite de dezechilibrul lor numeric *(disbioză)* sau de slăbire a forţelor de apărare a organismului, microorganismele componente ale microbiotei normale pot provoca procese patologice infecţioase cu manifestări clinice. În acelaşi timp, organismul este asaltat permanent de microorganisme patogene sau potenţial patogene din mediul extern. Datorită contactului permanent cu microorganismele, funcţia principală a sistemului imunitar al gazdei este apărarea faţă de microbiota proprie şi faţă de microorganismele din mediul extern.

Contactul permanent cu microorganismele a condus, în evoluţie, la apariţia unor sisteme celulare, a căror funcţie principală este anihilarea oricărei tentative de pătrundere a lor în mediul intern. Deosebit de sugestive în acest sens sunt formaţiunile limfoide asociate mucoaselor, la nivelul cărora contactul cu microorganismele este permanent şi masiv.

În concepţia modernă, starea de sănătate sub aspect infecţios este rezultatul unui echilibru între mijloacele de apărare ale organismului şi agenţii patogeni sau potenţial patogeni. Modificarea acestui raport în favoarea microorganismelor echivalează cu producerea procesului infecţios. Din aceste motive am considerat oportun să prezentăm, în contextul funcţiei imunitare, caracteristicile

microorganismelor patogene, precum şi mecanismele care se activează pentru a le îndepărta sau pentru a le minimaliza acţiunea. Bacteriile au rol important în patologia acută şi cronică, fie prin acţiunea directă ca urmare a multiplicării şi a produselor de metabolism, fie indirect prin reacţiile imunitare pe care le stimulează.

Microorganismele patogene posedă o serie de particularităţi structurale şi funcţionale, care le permit să depăşească diferitele mecanisme de apărare ale gazdei şi să iniţieze procesul infecţios.

Organismele superioare posedă 4 sisteme de apărare faţă de microorganismele patogene. În ordinea promptitudinii cu care îşi exercită efectul protector, cele 4 sisteme sunt următoarele: a) sistemul periferic al *tegumentului şi mucoaselor;* b) sistemul celulelor *fagocitare*, a căror acţiune se exteriorizează prin reacţia inflamatorie; c) sistemul factorilor humorali nespecifici (proteinele de „fază acută", properdina, sistemul complement, interferonii); d) *sistemul imunitar.*

CARACTERELE GENERALE ALE MICROORGANISMELOR PATOGENE

Bacteriile infecţioase prezintă două proprietăţi definitorii: *patogenitatea* şi *virulenţa.*

Patogenitatea

Patogenitatea este proprietatea esenţială a oricărui microorganism infecţios, ce constă în capacitatea lui de a determina în condiţii naturale sau experimentale, apariţia unui proces infecţios transmisibil, decelabil din punct de vedere clinic la om, animale sau plante.

Patogenitatea este, în esenţă, un caracter calitativ, de specie. Unele specii sunt totdeauna *patogene (M. tuberculosis, Shigella, Salmonella* etc.), iar altele nu sunt *niciodată patogene* datorită incapacităţii lor de a se stabili şi de a se multiplica într-un organism (*Azotobacter, Nitrobacter, Acetobacter* etc.). Cea de a treia categorie o reprezintă microorganismele *facultativ patogene* (oportuniste), care au capacitatea de a iniţia un proces patologic numai în anumite condiţii.

Microorganismele perfect adaptate acestui mod de viaţă implică un nivel al patogenităţii neletal pentru gazdă, pentru că odată cu moartea ei, posibilitatea diseminării agenţilor potogeni este limitată sau chiar anulată. Agenţii patogeni cei mai adaptaţi pentru a supravieţui sunt cei care provoacă infecţii uşoare,

cu un procent mare de îmbolnăviri subclinice şi care creează o imunitate slabă şi de scurtă durată.

Efectul patogen se poate datora acţiunii *directe*, asupra celulelor infectate, ori este rezultatul producerii toxinelor. Majoritatea efectelor patogene implică acţiunea *indirectă* datorată reacţiei gazdei şi efectelor secundare asupra organelor ţintă.

Studiul patogenităţii bacteriilor constă în identificarea factorilor de patogenitate, a importanţei fiecăruia dintre ei, a naturii lor chimice şi a mecanismului lor de acţiune asupra gazdei.

Uneori patogenitatea este rezultatul acţiunii unui singur produs bacterian şi se determină uşor *in vitro*, dar de cele mai multe ori patogenitatea este multifactorială.

Virulenţa

Virulenţa este o proprietate multifactorială şi exprimă capacitatea unei tulpini a unui microorganism patogen, de a se adapta, de a se multiplica şi de a determina o stare patologică la o gazdă sensibilă.

Virulenţa este o proprietate individuală a unei tuplini bacteriere şi se manifestă faţă de o anumită gazdă. Virulenţa se apreciază *in vivo* şi exprimă *cantitativ* gradul de patogenitate al unei tulpini bacteriene în raport cu o gazdă sensibilă. Din această cauză, adeseori, termenii de virulenţă şi patogenitate sunt folosiţi ca echivalenţi, dar în mod greşit, deoarece speciile de bacterii patogene au tulpini individuale cu grade diferite de virulenţă pentru diferite gazde.

Una din modalităţile de păstrare sau accentuare a virulenţei constă în pasajul succesiv pe gazde sensibile, iar tulpinile avirulente se obţin prin subcultivări *in vitro*.

Gradul de virulenţă ale unei tulpini bacteriene are o semnificaţie relativă. Diferenţe majore ale virulenţei unei tulpini bacteriene sunt create de alterări minime ale capacităţii de apărare a organismului. De exemplu, virulenţa şi capacitatea de a induce un proces patologic la *V. cholerae* este în raport invers cu aciditatea gastrică. Creşterea acidităţii măreşte rezistenţa şi invers, scăderea acidităţii gastrice este condiţia unei virulenţe crescute a aceleiaşi tulpini de *V cholerae.*

Factorii care condiţionează virulenţa

Virulenţa este o proprietate a bacteriilor patogene, condiţionată de 3 factori: a) *agresivitatea* sau capacitatea de invazie (invazivitatea); b) *infecţiozitatea;* c) *toxigenitatea.*

a) Agresivitatea

Agresivitatea defineşte capacitatea unui microorganism de a fi invaziv adică de a pătrunde în interiorul sau de a invada suprafaţa unui ţesut şi de a se multiplica, determinând modificări ale ţesuturilor respective. Consecinţa acestei proprietăţi este că bacteriile agresive vor determina infecţii cu tendinţa de generalizare, iar cele neagresive vor determina infecţii localizate.

Agresivitatea nu este o proprietate obligatorie printre bacteriile patogene care determină îmbolnăviri grave sau chiar mortale. Unele bacterii lipsite de capacitatea invazivă generează numai infecţii locale, dar eliberează toxine foarte puternice, care provoacă efectul letal prin intoxicaţie generalizată. De exemplu. *C. diphteriae*, rămâne localizată la nivelul gâtului, dar infecţia poate fi mortală, deoarece toxina sa foarte puternică se răspândeşte în tot organismul.

Agresivitatea este un parametru foarte important al virulenţei unor bacterii, deoarece chiar dacă este puţin toxigen, un microorganism agresiv cu o mare capacitate de colonizare a ţesuturilor provoacă efectul letal prin numărul mare de celule. De exemplu, *S. pneumoniae*, agentul pneumoniei nu este toxigen, dar fiind foarte virulent prin invazivitatea sa deosebită se dezvoltă în populaţii atât de numeroase în ţesutul pulmonar, încât perturbă funcţia sa, iar sfârşitul este letal.

Bacteriile care au o mare capacitate de invazie a ţesuturilor au proprietatea de a elabora diferite substanţe biologic active denumite generic *agresine*. Agresinele nu au proprietăţi toxice intrinsece, sau au efecte lezionale minime, dar favorizează colonizarea şi iniţierea procesului infecţios prin câteva mecanisme: facilitează difuzia microorganismului infecţios în ţesutul gazdei, interferă cu mecanismele de apărare şi le diminuă eficienţa, potenţează infecţiozitatea agenţilor patogeni.

Molecule şi structuri celulare cu rol de agresine

Agresinele sunt produse de o varietate largă de bacterii patogene (*B. anthracis, S. aureus, C. diphteriae, M. tuberculosis, Clostridium, Pseudomonas* etc.). Ele facilitează infecţiozitatea microorganismelor respective, printr-o varietate de mecanisme.

O primă categorie de agresine o reprezintă *factorii de difuziune*. Cel mai cunoscut factor din această categorie este *hialuronidaza*, enzimă cu efect hidrolizant asupra hialuronatului din substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv. După depolimerizarea hialuronatului, substanţa fundamentală se fluidizează şi astfel difuzia bacteriilor în ţesuturi este facilitată.

A doua categorie de agresine sunt acelea care *interferă cu factorii celulari și umorali bactericizi* nespecifici ai gazdei (fagocitele, lizozimul, complementul). Aceste efecte se atribuie *polizaharidelor capsulare* și unor componente ale peretelui celular. De exemplu, unele bacterii sintetizează molecule cu efect chimiotactic negativ asupra fagocitelor (*S. aureus, M. tuberculosis*), iar altele (*Brucella*) produc leucopenie marcată, prin efect direct supra măduvei hematogene. Structurile capsulare ale celulelor de *S. pneumoniae, H. influenzae, K. pneumoniae* inhibă aderența bacteriană de polimorfonucleare prin forțe electrostatice de respingere și prin proprietățile lor hidrofobe, dacă nu sunt opsonizate de către anticorpi.

O a III-a categorie de agresine o constituie o serie de *enzime* bacteriene care favorizează invazia prin alterarea integrității tisulare, prin citoliza locală sau la distanță a unor celule sensibile (leucocite, hematii), prin activarea mecanismelor fibrinolitice etc. Iată câteva exemple:

– *colageneza* produsă de *C. histolyticum* hidrolizează colagenul și astfel dezintegrează țesutul muscular;

– *lecitinaza* (fosfolipaza C) produsă de *C. perfringens, S. aureus, Pseudomonas* scindează lecitina (componentă a membranei celulare) în fosforilcolină și digliceríd, producând citoliză (tisulară, leucocitară, eritrocitară), precum și ruperea membranelor organitelor celulare (mitocondrii, reticul endoplasmic);

– *coagulazele* au ca efect coagularea fibrinogenului;

–*fibrinolizinele* (streptokinaza, stafilokinaza) produc liza cheagului sanguin care se formează local ca o reacție de apărare și favorizează diseminarea bacteriilor din rețeaua de fibrină;

– unele bacterii eliberează *toxine-enzime* cu acțiune selectivă asupra unor celule ale gazdei: *hemolizinele* lizează hematiile, iar *leucocidinele* distrug leucocitele;

– streptococul hemolitic produce *streptodornaza* care depolimerizează ADN.

Factorii care interferă cu răspunsul imun. Uneori microorganismele patogene supraviețuiesc în organismul gazdă prin mecanisme menite să reducă eficiența răspunsului imun sau chiar să-l anuleze. În acest sens se constată o similitudine accentuată din punct de vedere chimic a unor antigene bacteriene, cu unele componente ale organismului: *proteina M* a streptococului este asemănătoare cu constituenți ai *fibrei miocardice*, iar lipopolizaharidele bacteriilor Gram negative sunt înrudite cu antigenele de histocompatibilitate. *Capsula* celulelor de *Streptococcus pyogenes* conține acid *hialuronic*, care la rândul său este o componentă normală a țesutului conjunctiv și prin urmare materialul capsular nu este antigenic. Alteori, determinanții antigenici bacterieni sunt mascați de molecule protectoare ale gazdei: de exemplu, coagulaza

stafilococică asigură izolarea celulelor bacteriene într-un strat de fibrină; *T pallidum* produce un material polizaharidic extern, avid absorbant al proteinelor serice, care devin protectoare față de efectorii răspunsului imun. În alte cazuri se sintetizează anticorpi față de componente structurale neesențiale ale microorganismului patogen.

La rândul lor, microorganismele infecțioase sintetizează unele componente chimice, cu acțiune asupra răspunsului imun al gazdei, efectul fiind diminuarea reactivității sale:

– celulele bacteriene pot elibera antigene solubile de suprafață (polizaharide) care blochează anticorpii circulanți, sau desensibilizează limfocitele T;

– *Neisseria gonorrhoeae* produce o protează care scindează molecula de IgA_1, rupând legătura prolină–treonină a lanțului H în regiunea balama. Moleculele de IgA_2 nu sunt scindate. Tulpinile nepatogene de *N. gonorrhoeae* nu produc această protează;

– componenta polizaharidică a antigenului O (la *Enterobacteriaceae*), fiind situată la distanță de membrana externă a peretelui celular, deși leagă anticorpii specifici, împiedică liza mediată de complement. Anticorpii ineficienți au rolul de a bloca determinanții antigenici bacterieni. De aceea *specificitatea de epitop* a anticorpilor este foarte importantă pentru că fixarea complementului are loc la un situs bacterian care poate sau nu să producă liza celulei respective;

– celulele de *M. tuberculosis* au numeroase antigene proteice care ar trebui să inducă un răspuns imun humoral amplu, dar totuși sinteza de anticorpi rămâne nesemnificativă.

Variația antigenică este considerată a fi un factor de agresivitate. Virusurile și bacteriile au informația genetică necesară pentru a codifica un singur set de antigene de suprafață. Prin urmare, la bacterii, variația antigenică este limitată la cea care rezultă prin transferul materialului genetic între diferite tulpini ale aceleiași specii. În limitele aceleiași informații genetice, la virusuri și bacterii, variantele antigenice sunt practic absente.

Spre deosebire de virusuri și bacterii, la multe protozoare și paraziți pluricelulari, care au cicluri de viață complicate se produce fenomenul *variației antigenice* prin schimbarea periodică a antigenelor de suprafață ale unor celule ale tulpinii infectante (la *Plasmodium malariae*) sau prin comutare genică și activarea genelor pentru sinteza unor noi antigene de suprafață (la *Trypanosoma brucei*). Variația antigenică la *T. brucei* are loc în decursul unei singure faze a ciclului celular. Celulele au un înveliș de suprafață format din circa 7 milioane de molecule glicoproteice identice, cu g m de 61 kD. Ele au o specificitate antigenică distinctă la diferite subpopulații de *T. brucei*, coexistente în

organismul infectat. Diferitele variante antigenice ale glicoproteinelor de suprafaţă celulară sunt codificate de circa 1000 de gene distincte. Fiecare variantă antigenică este codificată de un set de gene ale acestui complex. Cu o frecvenţă mică, celulele pot să se comute de la o variantă antigenică la alta. Comutarea este rezultatul rearanjării genice prin translocaţie, fenomen prin care, dintr-un set mare de gene variante ale aceluiaşi caracter, periodic se schimbă gena din proximitatea unui promotor pentru a fi transcrisă. Această capacitate de schimbare a variantelor antigenice ale glicoproteinelor de suprafaţă conferă *T. burcei* calitatea unui adevărat „cameleon" antigenic.

Sistemul imunitar poate să elimine orice variantă antigenică a glicoproteinelor de *T. brucei*. Totodată va apare însă o nouă variantă antigenică, ce înlocuie rapid varianta antigenică precursoare şi astfel evită răspunsul imun. Variantele antigenice, în succesiunea lor preced cu o treaptă efectorii răspunsului imun şi astfel infecţia devine cronică.

Unul dintre cele mai interesante fenomene de variaţie antigenică este cel descris la virusul influenza A, la care hemaglutinina suferă continuu uşoare modificări ale structurii sale antigenice, ca rezultat al apariţiei unor noi variante genetice. Noile variante antigenice de virus iniţiază noi epidemii. De fapt, serul imun indus de ultima variantă antigenică este adeseori neutralizant pentru varianta antigenică precursoare, dar nu şi invers (anticorpii induşi de varianta precursoare nu neutralizează ultima variantă antigenică). Acest tip de variaţie limitată se numeşte *„drift" antigenic* (englez, drift = derivaţie). Sporadic se produce o modificare majoră a antigenelor de suprafaţă, denumită *„shift" antigenic* (englez, shift = schimbare). Modificarea este rezultatul recombinării materialului genetic a două linii de virus, complet diferite, care infectează simultan aceiaşi celulă (materialul genetic al virusului influenza se află sub forma a 8 segmente separate de ARN, care permit cu uşurinţă reasortarea genică în cazul unei coinfecţii).

O altă modalitate de evitare a unui răspuns imun eficient este eliberarea proteinelor „momeală". Acestea sunt antigene eliberate de unele microorganisme şi paraziţi care deviază răspunsul imun al gazdei de la ţinta antigenică majoră. De exemplu, *T. brucei* eliberează în soluţie, glicoproteine de suprafaţă, prin proteoliza limitată a capătului C-terminal al glicoproteinelor de suprafaţă. Antigenele solubile leagă anticorpii specifici faţă de glicoproteinele de suprafaţă ale celulelor de *T. brucei*.

b) *Infecţiozitatea*

Pentru a produce infecţia şi a se adapta la gazde noi, bacteriile trebuie să aibă o proprietate suplimentară, atribut al virulenţei şi anume *infecţiozitatea* (comunicabilitatea, contagiozitatea). Ea reprezintă capacitatea unui micro-

organism de a depăşi mijloacele de apărare a organismului, de a se implanta şi de a coloniza ţesuturile sănătoase, adică de a stabili o localizare şi de a forma un focar primar de infecţie.

Colonizarea ţesuturilor de către un microorganism patogen este o fază iniţială, critică pentru evoluţia procesului patologic şi este un fenomen complex, care implică atât implantarea cât şi utilizarea substanţelor nutritive disponibile în mediul gazdei.

Pentru a iniţia procesul infecţios, bacteriile trebuie să adere, adică să se ataşeze de celulele gazdă. Ataşarea este mediată de structuri specializate ale suprafeţei bacteriene, denumite generic *adezine*. Suportul aderenţei bacteriene este reprezentat, în primul, rând de celulele epiteliale.

Interacţiunea celor mai multe adezine cu receptorii de suprafaţă ai celulei sensibile este *specifică* şi *selectivă*, ceea ce are un rol hotărâtor asupra tropismului şi colonizării atât de către celulele bacteriene patogene, cât şi de către cele autohtone. Structurile bacteriene de aderenţă, anatomice sau moleculare sunt, de cele mai multe ori, *adaptative*, iar exprimarea lor fenotipică variabilă măreşte mult şansa aderenţei la diferiţi receptori celulari. Ele dispar prin cultivarea succesivă *in vitro*. De aceea tulpinile bacteriene de laborator sunt mai puţin aderente de suport, comparativ cu izolatele bacteriene proaspete.

Structuri moleculare şi anatomice cu rol de aderenţă

Mecanismul aderenţei celulelor de *E. coli*, la celulele epiteliale ale tractului urinar a fost studiat de Duguid în anii '50. Pe suprafaţa celulelor bacteriene infecţioase s-a remarcat prezenţa *fimbriilor*, care *in vitro* produc aglutinarea hematiilor.

Astăzi se cunoaşte specificitatea tisulară a aderenţei celulelor bacteriene, ceea ce explică faptul că *E. coli* este foarte comună în infecţiile tractului urinar, iar streptococii grupului A colonizează tractul respirator superior şi pielea, rareori fiind agenţii infecţiilor urinare. Un alt exemplu de specificitate a interacţiunii este *N. gonorrhoeae*. Aderă numai de celulele epiteliale ale tractului genital uman şi nu de alte celule, ceea ce explică limitarea spectrului de gazdă, la specia umană.

Aderenţa bacteriană este mediată de *lectinele* de suprafaţă, care recunosc specific şi se leagă de resturi glucidice ale unor molecule complexe ale celulei epiteliale.

Cele mai cunoscute structuri de aderenţă sunt fimbriile tip I de *E. coli*, care se leagă preferenţial de glicoproteinele celulare (epiteliale) care conţin manoză.

Receptorii celulelor epiteliale pentru lectinele fimbriale sunt diferiţi la diferite etaje ale tractului urinar, deoarece bacteriile nu aderă numai de carbohidratul terminal al moleculelor de suprafaţă, ci se leagă şi de glucide, situate în interiorul

moleculei. Diferite lectine bacteriene se pot lega de zone diferite ale aceluiaşi carbohidrat. Uneori oligozaharidul este expus parţial la suprafaţa celulei şi prin urmare, receptivitatea ei pentru diferite bacterii este variabilă. Capacitatea unui glucid de a funcţiona ca receptor al unei lectine bacteriene depinde nu numai de prezenţa zahărului respectiv, ci şi de accesibilitatea şi modul lui de prezentare.

Deoarece aderenţa bacteriană este o etapă critică în evoluţia procesului infecţios se studiază posibilitatea utilizării zaharurilor cu specificitate de legare a lectinelor bacteriene, pentru prevenirea infecţiilor şi pentru tratament. Această strategie se bazează pe faptul că zaharurile care au inhibat selectiv aderenţa bacteriilor de celulele epiteliale *in vitro*, pot fi folosite ca „momeli" moleculare pentru a intercepta bacteriile patogene, înainte ca ele să adere de celulele sensibile. Pe această cale a fost parţial inhibată aderenţa celulelor de *E. coli*, de epiteliul vezicii urinare, prin adăugarea zahărului specific al receptorului celular (manoza). Controlul infecţiilor prin blocarea receptorilor epiteliali, cu ajutorul zaharurilor este promiţător, deoarece diversitatea biochimică a fimbriilor face imposibilă administrarea unor preparate vaccinale.

La *E. coli* s-au descris structuri asemănătoare fimbriilor, mai subţiri şi mai ondulate, cu rol în aderenţă (notate K88 şi K99).

Flagelii amplifică infecţiozitatea bacteriană, deoarece asigură mobilitatea şi facilitează străpungerea stratului mucos care tapetează epiteliile mucoaselor. Rolul lor în colonizarea epiteliului şi în declanşarea procesului infecţios a fost demonstrat pentru *V. cholerae*. Tulpinile imobile sunt mai puţin virulente şi aderente la bordura în perie a celulelor epiteliului intestinal.

Mucopolizaharidele acoperă suprafaţa celulei bacteriene, formând un glicocalix, cu grade foarte diferite de dezvoltare: un glicocalix propriu-zis (fuzy coat), microcapsula sau capsula propriu-zisă. Moleculele sale componente au caracter anionic şi funcţionează ca o capcană de substanţe nutritive şi cationi, au rol protector faţă de virusuri şi fagocite şi formează o barieră faţă de factorii humorali ai apărării. Totodată facilitează aderenţa bacteriei de suprafaţa celulei gazdă.

Proteinele de aderenţa sunt proteine transmembranare ale bacteriilor Gram negative, care se leagă de receptorii celulei epiteliale. Pe suprafaţa acestora există un mare număr de proteine, care îndeplinesc diferite funcţii: unele au rol de *receptori* şi participă la transportul transmembranar, altele ancorează celula în matricea extracelulară. Toate sunt cunoscute sub denumirea de *integrine* (integrează celula în ambianţa tisulară). Aceste proteine pot să funcţioneze ca punţi de legătură între celula bacteriană şi cea epitelială. De exemplu, proteina

M de la *S. pyogenes* facilitează aderenţa bacteriei la epiteliul faringian. Proteine cu funcţie similară s-au descris la *N. gonorrhoeae*.

La *V. cholerae* funcţia de aderenţă o au *hemaglutininele*. Ele mediază o interacţiune strânsă între suprafaţa bacteriei şi microvilii celulei epiteliale. Aceleaşi molecule aglutinează eritrocitele.

Acizii lipoteichoici sunt molecule de aderenţă neadaptative, indispensabile supravieţuirii celulei bacteriene. Rolul lor s-a evidenţiat la *S. pyogenes*. După îndepărtarea capsulei de hialuronat (prin hidroliză cu hialuronidază streptococică), aderenţa bacteriană s-a intensificat. Numai anticorpii anti-acizi lipoteichoici au inhibat aderenţa bacteriană.

În procesul ataşării celulelor bacteriene de suprafaţa epitelială (sau de un suport inert), indiferent de mecanismul de realizare se disting două faze: o fază iniţială, *reversibilă*, mediată de interacţiunea forţelor intermoleculare necovalente (van der Waals, electrostatice); o fază *ireversibilă*, mediată de interacţiuni specifice între moleculele suprafeţei bacteriene şi receptorii celulei sensibile.

Interacţiunea specifică este evenimentul primar, prin care microorganismele iniţiază colonizarea suportului. Ea implică formarea unor legături stabile între receptorii celulei sensibile şi molecule ale suprafeţei bacteriene.

Proteinele membranare de virulenţă sunt situate în membrana externă a bacteriilor Gram negative şi funcţionează ca mecanisme moleculare de amplificare a infecţiozităţii. Dintre acestea, o atenţie deosebită s-a acordat proteinelor care înglobează Fe, denumite *siderofori*. Concurenţa pentru Fe între macroorganism şi bacteriile infecţioase este surprinzătoare, deoarece în organismul uman şi animal există o cantitate mare de Fe (circa 4,5 g la om). Lipseşte însă Fe disponibil – factor cheie al activităţii unor enzime ale metabolismului bacterian, deoarece este legat de proteine parţial saturate: lactoferina (LF) şi transferina (TF). Ambele leagă Fe cu constante foarte înalte de asociere, astfel încât Fe disponibil se găseşte în concentraţii foarte mici (10^{-18} M).

LF se găseşte în secreţia lactată, iar TF în ser. TF leagă doi ioni de Fe^{3+}/moleculă şi nivelul său normal de saturare este de 30%. Rolul acestor proteine în rezistenţa antiinfecţioasă nespecifică este dovedit experimental, *in vitro:* adăugarea Fe^{3+}, în exces faţă de capacitatea totală de legare a proteinelor anulează efectele lor antibacteriene.

LF, ca şi IgA se găseşte în secreţia mucoaselor digestivă şi respiratorie şi are rol în protecţia faţă de microorganismele infecţioase. Funcţia antibacteriană a LF se exercită şi în interiorul polimorfonuclearelor, în fagolizozom, prin acelaşi mecanism de legare a Fe.

Bacteriile infecţioase trebuie să dobândească Fe^{3+} prin două mecanisme: 1) prin competiţia cu proteinele gazdei pentru legarea Fe; 2) din combinaţiile cu Fe ale gazdei.

Competiţia cu proteinele parţial saturate ale gazdei, pentru legarea Fe este mediată de agenţii *chelatori* ai Fe. Unele serotipuri de *E. coli, K. pneumoniae, P. aeruginosa*, unele specii de *Salmonella* sintetizează enterochelina, un trimer ciclic al 2,3-dihidroxi-N-benzoil-serinei, cel mai puternic chelator al Fe.

A II–a modalitate de disponibilizare a Fe pentru bacterii este utilizarea sa din combinaţia hemică. Fierul hemic derivă din eritrocitele care se lizează. O dovadă certă a utilizării Fe hemic a fost adusă pentru *E. coli:* creşterea sa este foarte rapidă în cavitatea peritoneală, contaminată cu hem, după ligaturarea intestinului. De asemenea, *Y. pestis* creşte într-un mediu în care se adaugă proteine de legare a Fe şi hem. Dependenţa sa de hem este argumentată indirect de faptul că transmiterea infecţiei se face de către un artropod hematofag, care digeră eritrocitele de la gazda infectată şi în leziunea proaspătă regurgitează atât bacteriile cât şi hemul.

Capacitatea de a obţine Fe din moleculele complexe (TF, hemoglobină, mioglobină, LF) a fost evidenţiată pentru *Meningococcus*. La purtătorii de *Meningococcus*, celulele din orofaringe intră în competiţie pentru Fe cu LF iar în cursul procesului infecţios bacteriile mobilizează Fe din TF. Această proprietate nu este constitutivă, ci este indusă de nivelul scăzut al Fe disponibil. Toate tulpinile patogene de *Meningococcus* şi *Neisseria* utilizează LF ca sursă de Fe *in vitro*, în timp ce tulpinile nepatogene de *Neisseria* nu au această proprietate.

c) Toxigenitatea

Toxigenitatea (toxigeneza) reprezintă capacitatea unor agenţi patogeni de a elabora în cursul creşterii lor, una sau mai multe substanţe toxice şi este o caracteristică esenţială a patogenităţii bacteriene. Numeroase alte organisme (alge, fungi, protozoare, plante, animale) sintetizează toxine.

Ideea că bacteriile pot cauza îmbolnăviri prin producerea toxinelor a fost sugerată de Loeffler (1884), pe baza observaţiei că după inocularea subcutanată a unui mare număr de cobai cu bacili difterici a constatat existenţa leziunilor cu arie mare de răspândire în organism, din care bacteriile au lipsit. Concluzia a fost că bacilii s-au multiplicat la locul inoculării şi au produs o substanţă toxică, solubilă, care s-a răspândit la distanţă pe calea torentului sanguin.

Ulterior s-a observat că multe bacterii patogene produc toxine. De fapt simpla prezenţă a unui număr mare de bacterii în ţesuturi sau în umori nu este suficientă pentru a explica fenomenele patologice care însoţesc procesul infecţios. În unele cazuri, microorganismul patogen eliberează produse

metabolice care alterează desfăşurarea normală a metabolismului tisular, fără a fi ele însele toxice.

Toxinele bacteriene au fost descoperite de Roux şi Yersin (1888). Ei au arătat că unele specii bacteriene eliberează, *in vitro*, substanţe care reproduc leziunile şi simptomele caracteristice bacteriilor respective, iar uneori, după injectare au chiar efect letal.

Termenul de *toxină* derivă din cuvântul grecesc „toxicon" care înseamnă otravă. Orice substanţă macromoleculară cu efect toxic sau letal pentru un organism animal, vegetal sau uman este o toxină. Definiţia se extinde la efectul toxic *in vitro*, asupra celulelor, ţesuturilor sau organelor. Se cunosc circa 140 toxine proteice, din care 2/3 sunt produse de bacteriile Gram pozitive. Unele bacterii produc simultan între 5 şi 10 tipuri de toxine.

Capacitatea de a elabora toxine nu este limitată la bacteriile patogene propriu-zise. Numeroase saprobacterii produc substanţe toxice, uneori foarte puternice (toxina botulinică produsă de *Cl. botulinum*). Toxigenitatea bacteriilor variază în cadrul aceleiaşi specii şi este dependentă de condiţiile de mediu.

Pentru a-şi exercita efectul, toxinele trebuie să se elibereze din celule şi să se solubilizeze în umorile organismului. După sinteză, toxinele pot rămâne *asociate* permanent sau temporar cu celula sau sunt *eliminate* la exterior. Aceste diferenţe sunt dependente, în primul rând de specia producătoare, precum şi de fazele succesive ale evoluţiei unei populaţii bacteriene: de creştere exponenţială, staţionară sau de declin. Chiar toxinele care în faza exponenţială sunt asociate celulei, în faza de declin se găsesc libere în mediul extracelular datorită lizei. Din această cauză, studiul raportului topologic între celulă şi toxină are semnificaţie numai pentru faza de creştere a culturii bacteriene. Din acest punct de vedere se disting următoarele categorii de toxine:

a) toxine *localizate în celulă* (citoplasmatice) produse de bacterii Gram negative (*S. dysenteriae*, *Y. pestis*, *B. pertusis*, *E. coli* etc.) şi Gram pozitive (enterotoxina de *Cl. perfringens*, streptolizina S, toxina produsă de *Cl. difficile*, pneumolizina produsă de *S. pneumoniae*). Ele sunt de natură proteică;

b) toxinele *constitutive* ale peretelui celular, produse numai de bacteriile Gram negative şi care corespund *endotoxinelor* clasice. Din punct de vedere chimic sunt complexe glico-lipidice sau glico–lipo–proteice.

Toxinele constitutive nu sunt niciodată eliberate în cursul fazei de creştere exponenţială şi nici după îndepărtarea peretelui celular;

c) toxinele *eliminate* în mediul extern sau *exotoxinele* propriu-zise sunt de natură proteică şi sunt produse mai frecvent de bacteriile Gram pozitive (toxina difterică, toxinele stafilococice, toxina de *B. anthracis*), dar şi de cele

Gram negative (*V. cholerae, P. aeruginosa*). Bacteriile Gram negative conţin cantităţi superioare de lipide în alcătuirea peretelui, ceea ce limitează excreţia macromoleculelor;

d) toxine cu *localizare mixtă* (endocelulară şi exocelulară). În faza exponenţială sunt secretate parţial în mediu, dar o fracţie semnificativă rămâne în interiorul celulei şi este eliberată după autoliză (toxinele tetanică, botulinică, produse de specii ale g. *Clostridium*).

Mult timp s-a considerat că exotoxinele sunt de natură proteică, iar endotoxinele – de natură lipopolizaharidică. Această diferenţiere nu este netă, deoarece unele toxine proteice aparţin categoriei endotoxinelor, fiindcă rămân asociate celulei producătoare, şi invers, uneori, toxinele de natură lipopolizaharidică sunt eliminate la exterior, ca exotoxine. De aceea, clasificarea toxinelor trebuie să se facă după criteriul compoziţiei chimice. Din acest punct de vedere, majoritatea exotoxinelor sunt de natură *proteică*, iar majoritatea endotoxinelor sunt *lipopolizaharidice*.

În raport cu tropismul lor se disting *neurotoxine*, *enterotoxine*, *cardiotoxine*, cu efecte limitate la ţesutul respectiv, sau toxine *pantrope*, cu efecte asupra mai multor categorii de ţesuturi.

Toxine de natură proteică

Majoritatea toxinelor de natură proteică sunt *exotoxine*. Ele se sintetizează sub forma unei proteine precursoare, mai lungă decât proteina extracelulară, ce cuprinde o secvenţă N-terminală de 15–30 aminoacizi, hidrofobă, a cărei funcţie este traversarea membranei. Ea este excizată de o peptidază membranară şi rezultă proteina hidrofilă, activă funcţional.

In vivo, exotoxinele sunt eliminate la locul multiplicării bacteriilor, de unde sunt transportate la distanţă şi îşi exercită efectul asupra ţesuturilor sensibile. *In vitro*, exotoxinele sunt eliminate în mediul de cultivare. Eliberarea lor are loc predominant în faza de creştere exponenţială, astfel încât concentraţia lor în mediu este maximă la sfârşitul perioadei de creştere, sau la scurt timp după aceea. Unele exotoxine sunt eliberate nu numai ca produse de secreţie, ci şi după autoliza celulei. Astfel, o cantitate oarecare de toxină tetanică şi botulinică părăseşte celula intactă prin *difuziune*, dar o proporţie semnificativă rămâne legată de corpul celulei şi este eliberată prin autoliză sau sub acţiunea diferiţilor factori.

Comparativ cu alte substanţe toxice, exotoxinele bacteriene au o toxicitate foarte ridicată, atât în stare brută sub forma filtratelor de cultură, dar mai ales în formă purificată. În cazul filtratelor de cultură, DL_{50} (*doza letală* 50 sau

cantitatea de toxină care omoară jumătate din animalele de experienţă) la cobai este:

0,002 ml pentru toxina difterică

0,0005 ml pentru toxina tetanică

0,0001 ml pentru toxina botulinică.

Exotoxinele purificate au un efect toxic impresionant. Toxina botulinică, purificată şi cristalizată – cea mai puternică toxină naturală – conţine într-un mg – 1200000 DLM (*d*oze *l*imite *m*ortale) pentru 1 kg corp (adică 1 mg toxină omoară 1200000 kg cobai). Ar fi suficiente 300 g de toxină purificată pentru a omorî toată populaţia globului. Toxicitatea toxinei tetanice este cu puţin inferioară. *In vitro* se apreciază că o singură moleculă de toxină difterică este suficientă pentru a omorâ o celulă, iar pentru liza unei plachete saunguine umane sunt necesare 15 molecule de streptolizină O. Toxina botulinică este de circa un milion de ori mai puternică decât stricnina şi de 15000 de ori faţă de a aconitinei – cel mai puternic alcaloid. Doza letală este mai mică după administrarea intravenoasă, în raport cu alte căi parenterale. Pe cale orală sunt active enterotoxinele perfringens, stafilococică, holerică şi neurotoxina botulinică. Dozele letale pentru căile respiratorie şi digestivă sunt de 100–1000 ori mai mari decât pentru căile i.v, i.m, i.p sau s.c. Pielea intactă este o barieră eficace, dar cea mai mică rană este o cale de acces a toxinei.

Structura moleculară a toxinelor bacteriene

Majoritatea toxinelor bacteriene sunt holoproteine. Câteva au fost purificate şi cristalizate (difterică, botulinică, holerică, tetanică, toxina dermo-exfoliatoare stafilococică). Greutatea moleculară variază între 2000 (enterotoxina termo-stabilă de *E. coli*) şi 150000 (toxinele tetanică şi botulinică).

Ca model general de structură moleculară, exotoxinele bacteriene sunt similare hormonilor glicoproteici: ambele tipuri de molecule sunt alcătuite fie din două lanţuri, fie din două subunităţi, notate cu A şi B. Lanţul A are activitate biologică, iar lanţul B mediază legarea de receptorul celular. Toxina tetanică este monocatenară în formă nativă endocelulară, dar în procesul secreţiei este clivată şi rezultă două catene peptidice unite prin punte S–S între cele două resturi cisteinil situate de o parte şi de alta a punctului de clivare.

Neurotoxinele botulinice, în interiorul celulei sunt monocatenare (g m 150 000), dar după clivarea proteolitică rezultă două lanţuri peptidice legate printr-o punte S–S.

Subunitatea A a toxinei holerice este alcătuită din două peptide (A_1 şi A_2), inegale, legate printr-o punte S–S.

Structura primară completă a fost clarificată pentru enterotoxina stafilococică B, pentru fragmentul A al toxinei difterice şi pentru lanţul B al toxinei holerice. Ultimul are o homologie semnificativă a secvenţei sale cu 4 hormoni glicoproteici: tireotropina bovină, hormonul luteotrop bovin, gonadotropina corionică umană şi hormonul foliculostimulant uman.

Cîteva toxine sunt *glicoproteine*: exotoxina de *Corynebacterium ovis*, toxinele eritrogenè streptococice A şi B, şi toxina dermo-exfoliatoare stafilococică. Streptolozina S este un nucleopeptid dimeric. Fiecare monomer este alcătuit dintr-un lanţ peptidic de 32 aminoacizi, asociat cu un oligoribonucleotid bogat în guanină, iar toxina de *C. perfringens* pare a fi o metaloproteină cu Zn.

Unele toxine prezintă un *polimorfism antigenic* evident, deşi din punct de vedere farmacologic sunt identice. De exemplu, toxina botulinică prezintă 7 serotipuri (notate A → G), care nu dau reacţie încrucişată semnificativă cu anticorpii obţinuţi faţă de una dintre ele. Neutralizarea fiecărei variante este realizată numai de anticorpii homologi. Polimorfismul antigenic este probabil rezultatul unor mutaţii care au afectat numai situsurile antigenice ale moleculelor de toxină, dar determinanţii de toxicitate au rămas nemodificaţi.

Este cunoscută şi situaţia inversă, în care, toxine bacteriene diferite sunt înrudite imunologic, adică prezintă reactivitate încrucişată. Se cunosc 3 grupe de toxine care dau reacţii încrucişate:

1) Toxinele tiol-dependente formează un grup de 15 proteine citolitice, sintetizate de diferite bacterii Gram pozitive. Prototipul lor este streptolizina O. Efectele ei cardiotoxice şi hemolitice depind de prezenţa grupărilor *tiol* în moleculă. Aceste toxine sunt inactivate prin oxidare, dar activitatea lor biologică este restabilită prin reducere. Efectele lor sunt inhibate de colesterol şi de alţi steroli. Ele au determinanţi antigenici comuni şi reacţionează încrucişat cu anticorpii neutralizanţi sau precipitanţi, obţinuţi faţă de una dintre ele.

2) Enterotoxinele termolabile de *E. coli, V. cholerae, K. pneumoniae, S. typhimurium*. Reactivitatea lor încrucişată este explicabilă prin existenţa determinanţilor genetici comuni, consecinţă a transferului intergeneric de material genetic.

3) Toxinele de *C. difficile* şi *C. sordelii* au deasemenea reactivitate încrucişată.

Determinismul genetic al sintezei toxinelor

Sinteza toxinelor bacteriene este codificată de gena *tox* a cărei localizare este cromosomală, plasmidială sau fagică.

La *V. cholerae*, gena *tox* care codifică sinteza enterotoxinei are situs cromosomal şi prezintă 4 alele.

Enterotoxinele şi hemolizinele de *E coli*, toxina dermo-exfoliatoare stafilococică sunt codificate de gene plasmidiale.

Gena *tox*, codificatoare a toxinei difterice aparţine genomului unor bacteriofagi ADN (β, P, l, W), iar controlul ei este realizat de o genă situată pe cromosomul bacterian.

Fagii purtători ai genei *tox* se găsesc în celulele de *C. diphteriae* sub formă de profag, de fag virulent replicativ, fie sub formă de replicon autonom neintegrat în cromosomul bacterian, dar în stare de represie. Este cunoscut modul de funcţionare a genei *tox*, purtată de fagul β, ce se integrează ca profag. Ea se găseşte aproape de situsul de inserţie cromosomală a genomului fagic, dar are propriul său promotor şi se poate exprima independent de alte gene fagice, după cum poate fi represată fără să afecteze biosinteza altor proteine fagice. Această genă nu pare a fi esenţială pentru genomul fagic. Modificarea ei mutaţională nu afectează ciclul de replicare a fagului.

Gena *tox* de origine fagică conferă toxicitate altor două tulpini de *C. diphteriae*, varietatea *ulcerans*, infecţioasă pentru iepure şi om şi varietatea *ovis*.

Sinteza toxinei eritrogene streptocicice (scarlatinoasă), precum şi a toxinelor botulinice C şi D este deasemenea codificată de fagi temperaţi.

La *C. perfringens*, toxigeneza este legată de procesul sporulării. Sporularea este o condiţie obligatorie, dar insuficientă pentru producerea toxinei. Toxina pare a fi un produs al genei de sporulare, o proteină de structură a tunicii sporale.

Rolul toxinelor în patogeneză bacteriană

Unele toxine (tetanică, difterică, botulinică, holerică, eritrogenă) au un rol determinant în patogenitatea bacteriană. Primele 4 enumerate mai sus sunt factori unici ai patogenităţii pentru bacteriile producătoare. În cazul holerei, gravitatea infecţiei este rezultatul consecinţelor fiziopatologice nespecifice (pierderea apei şi sărurilor pe cale intestinală) ale toxinei asupra mucoasei.

Eritemul specific scarlatinos este datorat efectului primar al toxinei eritrogene streptococice.

Enterotoxinele stafilococice şi enterotoxina *perfringens* produc efecte patogene ca rezultat al intoxicaţiei alimentare, în special în colectivităţi.

Dizenteria produsă de *Shigella* este deasemenea consecinţa acţiunii toxinei, deoarece enterocitele şi celulele endoteliale ale vaselor mici mor şi provoacă ulcerarea mucoasei intestinale.

Exotoxina de *B. anthracis* produce edem local şi hemoragie, iar în infecţia septicemică, efectul letal pare a fi datorat efectelor sale neurotrope, în special asupra centrului bulbar al respiraţiei.

Efectele biologice ale toxinelor pot fi considerate ca având loc la 4 nivele de structură:

– la nivelul *organelor și țesuturilor*, pe baza căruia se disting neurotoxine, cardiotoxine, enterotoxine, nefrotoxine;

– la nivelul *celulelor*: hemolizine, leucocidine, citotoxine, dermotoxine;

– la nivelul sistemelor *subcelulare* (membrane, organite, lanțuri transportoare de electroni);

– la nivelul sistemelor moleculare.

Ultimele două nivele de acțiune sunt puțin cunoscute.

Receptori celulari pentru toxine

Interacțiunea toxinelor cu celulele sensibile, asemenea altor molecule bioactive (hormoni, antigene, lectine, mediatori) este mediată de molecule specifice denumite *receptori*. Moleculele receptor se găsesc în stratul extern al membranei citoplasmatice. Celulele sensibile nu au receptori specifici pentru toxine, deoarece ele nu-și programează structuri moleculare pentru a se sinucide. Toxinele „parazitează" receptorii care în mod obișnuit au rolul de a îngloba molecule utile metabolismului celular.

Natura chimică a receptorilor câtorva toxine este cunoscută. Receptorul streptolizinei O este colesterolul, iar alte câteva toxine diferite au ca receptori gangliozidele. Acestea sunt glicolipide hidrosolubile ale suprafeței celulare, în special în neuroni, alcătuite dintr-o componentă oligozaharidică, legată de un ceramid (acid stearic și sfingozină). Gangliozidele diferă între ele prin numărul și secvența glucidelor componente, în special a acidului N-acetil neuraminic (NANA) sau acid sialic.

Toxina tetanică se leagă de gangliozide, în special de di- și tri-sialo-gangliozide, care conține două și respectiv trei resturi de acid sialic, atașate de galactoză. Între toxina tetanică și hormonul tireostimulator (TSH) există o competiție de legare strict reciprocă, pe membrana celulelor tiroidiene. Pe baza acestor rezultate s-a dedus că receptorul neuronal pentru toxina tetanică este asemănător cu receptorul celulei tiroidiene pentru TSH. Moleculele de glicolipide (gangliozide) sau glicoproteinele cu o catenă polizaharidică asemănătoare ar putea fi receptorii toxinei tetanice.

Receptorul celular pentru toxina *holerică* este o gangliozidă. Efectul toxinei asupra celulelor adipoase și asupra ansei intestinale de iepuri, *in vitro*, este blocat prin incubarea prealabilă a toxinei cu preparate brute de gangliozide. Gangliozida receptor este un glicolipid (GM_1). S-a observat o corelație directă între conținutul membranar în GM_1 și sensibilitatea tisulară la toxină. O linie de fibrobalaste de șoarece deficiente în sinteza GM_1 nu răspunde la toxina

holerică, dar integrarea GM_1 exogenă în membrana acestor celule a reconstituit o sensibilitate maximă la acțiunea toxinei.

Aceleaşi molecule (GM_1) au rol de receptor pentru toxina termo-labilă de *E. coli,* foarte asemănătoare toxinei holerice.

Receptorul celular al toxinei de *B. pertusis* pare a fi tot o gangliozidă care conține acid sialic.

Receptorul celular pentru toxina *difterică* ar fi o *glicoproteină,* deoarece tratamentul celulelor sensibile cu neuraminidază determină o uşoară intensificare a efectului toxic. Aceasta denotă că un carbohidrat expus după tratamentul cu neuraminidază, ar putea fi implicat în legarea toxinei.

Exotoxina de *S. dysenteriae* s-ar lega de resturile oligozaharidice legate β-1-4 de N-acetil-D-glucozamină ale unei glicoproteine.

În raport cu localizarea țintei lor moleculare se disting după tipuri generale de acțiune a toxinelor:

– cele care au ținta finală la nivelul *membranei;*

– toxine a căror țintă finală este *citoplasmatică.*

Ținta *finală* este structura a cărei interacțiune cu toxina produce efectul toxic, în timp ce ținta *intermediară,* care include şi *receptorul* înlesneşte acțiunea toxinei. În unele cazuri, ținta finală este însuşi receptorul.

Toxinele a căror țintă finală este *localizată în membrană* acționează prin modificări structurale ale membranei citoplasmatice, urmate de ruperea acesteia. Consecința este citoliza ori moartea celulei. Multe toxine îşi exercită efectul asupra celulelor prin dezorganizarea membranei. Acestea se numesc *hemolizine* (citolizine), deoarece eritrocitele se utilizează în mod curent pentru titrarea şi studiul efectelor lor citolitice.

Toxinele a căror țintă primară este *intracelulară* acționează asupra unor molecule după ce au traversat membrana citoplasmatică.

Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă

Toxinele bacteriene a căror țintă este intracelulară sunt molecule bifuncționale, ca şi toxinele vegetale (ricina), bacteriocinele sau hormonii glicoproteici. Toate aceste categorii de molecule sunt alcătuite după acelaşi model: sunt *monocatenare* (toxina difterică, exotoxina de *P. aeruginosa*) sau sunt *dimere* (enterotoxinele holerică şi termolabilă de *E. coli*). Cele monocatenare au un segment COOH-terminal de legare la nivelul receptorului şi un segment NH_2–terminal, care pătrunde în citoplasmă şi interacționează cu ținta intracelulară. Pentru cele dimere, funcțiile de legare (B) şi de activitate propriu-zisă (A) sunt realizate separat de fiecare catenă.

Pătrunderea toxinei în celulă se realizează prin următoarele mecanisme: a) endocitoză mediată de receptori; b) pinocitoză nespecifică în faza lichidă; c) transferul direct al moleculei prin membrana citoplasmatică. Înglobarea prin mecanismul endocitozei mediată de receptori conferă specificitatea şi eficienţa pentru moleculele mari. Receptorii celulari de toxină, fiind destinaţi unor funcţii normale sunt în număr mare faţă de numărul moleculelor de toxină necesare pentru a induce efectul biologic. De exemplu, 4–10 molecule de toxină holerică şi una singură de toxină difterică sunt inductoare ale efectelor specifice de intensitate maximă.

Dinamica receptorilor după interacţiunea cu moleculele de toxină s-a studiat în cazul celor de natură glicoproteică. În mod normal (libere, neocupate de ligand), aceste molecule sunt distribuite uniform în planul membranei sau sunt concentrate în zone specializate denumite *zone tapetate* (coated pits) cu *clatrină*, un înveliş de natură proteică pe faţa citoplasmatică a membranei.

După legarea moleculei de toxină, complexele receptor-toxină se aglomerează în zonele tapetate cu clatrină situate la baza microvilozităţilor. Zonele respective se invaginează şi formează *vezicule acoperite cu clatrină*, cu rol de transport. În citoplasmă, învelişul de clatrină se dezorganizează şi receptorii celulari deveniţi disponibili sunt reciclaţi spre suprafaţa celulei, – iar molecula transportată (toxina) este eliberată spre un situs intracelular specific.

MECANISMELE DE ACŢIUNE CELULARĂ ŞI MOLECULARĂ A PRINCIPALELOR GRUPE DE TOXINE

Toxigenitatea toxinelor proteice este caracterizată prin *specificitate* (adică efecte farmacologice proprii fiecărei toxine sau grup de toxine) şi prin *intensitatea* considerabilă, mult superioară altor toxine vegetale, animale sau chimice.

Toxine citolitice

Toxinele citolitice, denumite şi *citolizine* acţionează la nivelul membranei citoplasmatice şi produc schimbări conformaţionale ale reţelei glicolipoproteice membranare, consecinţa fiind ruperea acestei bariere osmotice şi eliberarea componentelor solubile şi a organitelor în mediul exterior, sau o dezorganizare a acestei reţele moleculare, incompatibilă cu viaţa.

Unele toxine citolitice au acţiune *enzimatică fosfolipazică de tip C* (toxina α de *Cl. perfringens*). Ele hidrolizează fosfatidil-colina, sfingomielina, lecitina şi alte substraturi lipidice, la nivelul legăturii ester a acidului fosforic şi eliberează un diacil-glicerol şi componenta fosforilată.

Streptolizina O redusă se fixează pe colesterolul de la suprafaţa membranei celulare şi modifică interacţiunea sa normală cu fosfolipidele adiacente, rezultatul fiind o creştere a rigidităţii membranei.

Toxinele cu efect membranar s-au dovedit a fi utile ca sonde moleculare în studiul biomembranelor. S-a estimat mărimea porilor membranari prin studiul mobilităţii moleculelor radiomarcate, de diferite dimensiuni.

Toxine neutrotrope

Din această categorie fac parte toxinele tetanică, botulinică şi într-o măsură mai mică, toxina cărbunoasă. Efectele lor se produc asupra ţesutului nervos central sau periferic şi interferă cu transmiterea influxului nervos. Consecinţele sunt paralizia spastică, flască şi respectiv blocarea centrului respirator bulbar.

Toxina tetanică

Molecula de toxină tetanică este sintetizată sub formă monocatenară. Sub acţiunea proteazelor bacteriene din mediul de creştere, molecula nativă este incizată şi rezultă un lanţ greu (100 000 D) şi unul uşor (50 000 D), care rămân legate printr-o punte S–S şi prin interacţiuni necovalente.

Sinteza toxinei are loc, în special, la sfârşitul perioadei de creştere logaritmică, ceea ce sugerează o competiţie între creşterea masei celulare şi sinteza toxinei, la nivelul transcrierii.

În prezenţa O_2 se produce liza celulară şi toxina este eliberată, iar în anaerobioză, toxina rămâne în celulă sub formă monocatenară.

In vitro, toxina se leagă numai de celule derivate din sistemul nervos central, iar *in vivo* legarea se face preponderent de substanţa cenuşie. Neurotropismul se explică prin specificitatea de legare a toxinei de gangliozidele cerebrale, care conţin două unităţi de galactoză, două unităţi de N-acetil-glucozamină şi 3 resturi de acid N-acetil-neuraminic.

După injectarea plantară, cu ajutorul toxinei radiomarcate cu iod s-a reconstituit următorul traseu: terminaţii nervoase motorii, trunchiul nervului, rădăcina ventrală, motoneuronii α din coarnele anterioare. Are loc un transport retrograd. Toxina se fixează pe sinaptosomii componentei presinaptice.

Toxina tetanică acţionează la nivel presinaptic, printr-un mecanism molecular necunoscut. Ea produce blocarea eliberării mediatorilor cu efect inhibitor asupra motoneuronilor. Consecinţa este paralizia spastică a musculaturii. Efectele sale se exercită asupra circuitelor-polisinaptice, care includ interneuroni Renshaw de tip inhibitor.

Toxina tetanică reproduce toate simptomele tetanosului clinic. Calul este foarte sensibil, dar manifestările tetanice apar rareori la porc şi câine. Păsările sunt rezistente.

Câteva mii de persoane, anual, pe glob sunt afectate de această infecţie toxigenică.

Toxina botulinică

Toxina botulinică este produsă de *C botulinum*. În formă nativă, molecula este monocatenară, cu g m de 150 kD. Cea mai mare parte a toxinei se eliberează după autoliză. *In vitro*, liniile bacteriene proteolitice clivează pretoxina sub acţiunea proteazelor proprii, în mediul extracelular. *In vivo*, molecula precursoare produsă de tulpinile neproteolitice este scindată sub acţiunea proteazelor intestinale, înainte ca toxina să fie absorbită în sânge. După clivare rezultă două catene polipeptidice, de 100 kD şi respectiv de 50 kD, legate între ele printr-o punte S–S. Activitatea toxică se manifestă numai după clivare.

Se cunosc 8 variante antigenice ale toxinei botulinice: A, B, C_1, C_2, D, E, F, G. Majoritatea tulpinilor de *C. botulinum* sintetizează o singură variantă antigenică de toxină. Toate variantele au g m de 150 kD şi produc aceleaşi efecte farmacologice.

Mecanismul de acţiune. Legarea toxinei de receptorii trigangliozidici (GT_1) se face prin intermediul catenei grele. Activitatea neurotoxică se exercită, în esenţă, la nivelul sistemului nervos periferic. Toxina botulinică blochează transmiterea impulsului nervos la nivelul sinapselor colinergice ale fibrelor nervoase preganglionare parasimpatice şi simpatice, ale fibrelor parasimpatice postganglionare şi ale terminaţiilor somatice motorii. Efectul ei se produce la nivel presinaptic şi constă în inhibarea eliberării acetilcolinei din veziculele sinaptice. Se pare că este stopată pătrunderea Ca^{2+} în vezicule, etapă obligatorie a exocitozei conţinutului lor.

Sistemul nervos central pare a fi protejat de acţiunea toxinei botulinice, fie de bariera hematoencefalică, fie de absenţa receptorilor.

Ca şi în cazul toxinei tetanice s-a sugerat posibilitatea unui transport axonal retrograd al toxinei botulinice până la nivelul sistemului nervos central. Efectul s-ar exercita asupra sinapselor colinergice excitatoare. Rezultatul intoxicaţiei, prin ingestia alimentelor în care s-a multiplicat *C. botulinum* este paralizia musculară flască, similară celei consecutive secţionării nervului. Muşchiul rămâne însă excitabil şi se contractă la o excitare directă. Conductibilitatea nervoasă nu este alterată. De aceea se consideră că toxina acţionează la nivelul joncţiunii neromusculare.

Funcţia musculară se restabileşte într-un interval lung, necesar regenerării unor noi structuri sinaptice, ca şi în cazul denervării chirurgicale a muşchilor.

În concepţia clasică, botulismul era considerat exclusiv de natură toxică, consecutiv ingestiei alimentelor conservate, contaminate cu Cl botulinum insuficient sterilizate. Recent s-a avansat ideia *toxiinfecţiei botulinice*, care survine după ingestia, odată cu alimentele, a celulelor de *C. botulinum*. Ele se multiplică în lumenul intestinal şi produc toxină, care este absorbită în circulaţie. Toxina liberă este sensibilă la acţiunea enzimelor digestive, dar cea complexată cu un suport proteic este stabilă şi foarte eficientă în ceea ce priveşte producerea efectelor toxice.

C. botulinum se multiplică, deasemenea, în plăgile contaminate cu granule de sol.

Toxina cărbunoasă

Bacillus anthracis produce o exotoxină care s-a pus în evidenţă prin faptul că moartea organismelor infectate survine după depăşirea fazei acute a bacteriemiei, sub acţiunea protectoare a antibioticelor. Plasma sterilizată prin filtrare, a cobailor morţi după infecţia cărbunoasă, injectată subcutanat produce edem la cobaiul sănătos şi are efect letal după injectare intravenoasă.

Toxina este produsă de liniile necapsulate şi constă din 3 componente distincte din punct de vedere chimic:

– factorul I, denumit *factor de edem* este o glicoproteină care dă o singură linie de precipitare cu antiserul corespunzător;

– factorul II este *antigenul protector*, deoarece este imunogen şi stimulează răspunsul imun în cursul infecţiei cărbunoase. Este o proteină de 100 kD. Proteina nativă, purificată pe DEAE-celuloză, urmată de gel-filtrare produce o singură linie de precipitare cu antiserul omolog, dar prin învechire îşi pierde antigenitatea, păstrându-şi specificitatea serologică;

– factorul III denumit *factor letal* este de natură proteică. Efectul său letal se manifestă numai dacă este administrat în amestec cu factorii I şi II.

Toxina, produsă *in vivo* sau *in vitro* (pe mediu cu hidrolizat de cazeină) este letală şi produce edem. Factorii componenţi, injectaţi separat nu au efecte toxice.

În infecţia cu *B. anthracis*, toxina este un factor de virulenţă. Ea interferă cu activitatea fagocitelor şi anulează efectul bactericid al serului, ceea ce favorizează iniţierea infecţiei.

Edemul este consecinţa modificărilor permeabilităţii capilare.

Toxina cărbunoasă este letală prin acţiunea sa asupra centrilor respiratori bulbari.

Toxina difterică

Molecula de toxină difterică este cea mai cunoscută în ceea ce priveşte mecanismul de acţiune la nivel celular şi molecular.

Toxina este sintetizată sub forma unei singure catene polipeptidice de 62 kD, stabilizată prin două punţi S–S. Prima, în jumătatea N–terminală închide o buclă între aminoacizii 186 şi 201, iar cea de a II-a este situată în jumătatea COOH terminală. Bucla N–terminală conţine 3 resturi de arginil, ce se rup uşor sub acţiunea proteazelor de tipul tripsinei din supernatantul celular, secretate odată cu toxina. După clivarea enzimatică rezultă două polipeptide: fragmentul A (englez, *a*ctivity) (21500 D) şi fragmentul B (englez, *b*inding) (40500 D), legate prin puntea S–S. Fragmentul B mediază legarea de receptorul celular (o glicoproteină), iar fragmentul A exercită efectul specific. Atât molecula nativă cât şi cea clivată sunt citotoxice, dar subunităţile A şi B separate nu au activitate biologică. În prezenţa substanţelor reducătoare care conţin o grupare tiol, legătura S–S se rupe şi cele două fragmente se separă.

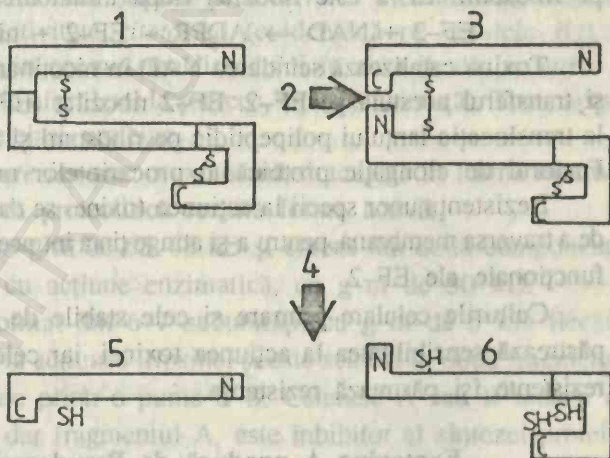


Fig. 60. Reprezentare schematică a structurii moleculei de toxină difterică. Molecula este alcătuită din două fragmente (A şi B) şi are g m de 62 kD. *In vivo* este activă numai în formă clivată, sub acţiunea unei proteaze care separă cele două fragmente, dar care rămân asociate printr-o legătură S–S. Sub acţiunea agenţilor reducători, cele două fragmente, se separă complet şi îşi pierd activitatea (1 = molecula întreagă cu g m de 62 kD; 2 = proteaza; 3 = toxina clivată; 4 = reducere; 5 = fragmentul A, de 24 kD; 6 = fragmentul B, de 38 kD) (după Bizzini, 1976).

Toxina difterică își exercită efectele toxice asupra anumitor specii: omul, iepurele și cobaiul sunt foarte sensibile, iar șoarecele, șobolanul și majoritatea nevertebratelor sunt rezistente. Metoda de titrare a toxinei constă în injectarea intradermică la cobai și aprecierea efectului dermonecrotic, iar la om permite evaluarea imunității antidifterice (reacția Schick).

Toxina pătrunde în celulă fie pe calea *pinocitozei nespecifice* (calea neproductivă, fără efecte toxice, deoarece este degradată în celulă), fie pe calea *specifică a endocitozei mediate de receptori* (calea productivă, cu manifestarea efectelor toxice).

Fragmentul B, prin regiunea COOH–terminală interacționează cu receptorii celulei sensibile, creînd un canal în membrană, în care se inseră fragmentul hidrofob A. Puntea S–S care reunește cele două fragmente se rupe sub acțiunea glutationului intracelular și eliberează fragmentul A.

Efectul primar al toxinei difterice constă în inhibiția sintezei proteice, dar celelalte activități metabolice rămân normale timp de câteva ore. Ținta acțiunii toxinei este factorul 2 de elongație a lanțului polipeptidic (EF–2). În prezența NAD, toxina difterică inactivează EF–2. EF–2 este o polipeptidil–ARNt–transferază și este implicat în biosinteza lanțului polipeptidic, în etapa de translocație pe ribosomi. EF–2 este ribozilat după următoarea reacție globală:


$$EF\text{–}2 + NAD \rightarrow ADPR - EF\text{–}2 + \text{nicotinamida} + H^{+}.$$

Toxina catalizează scindarea NAD în nicotinamidă și ADP ribozil, precum și transferul acestuia pe EF–2. EF–2 ribozilat (EF–2–ADPR) nu mai participă la translocația lanțului polipeptidic pe ribosomi și sinteza proteică este blocată. Factorul de elongație proteică al procariotelor nu este inhibat.

Rezistența unor specii la acțiunea toxinei se datorează incapacității acesteia de a traversa membrana, pentru a-și atinge ținta intracelulară și nu unor particularități funcționale ale EF–2.

Culturile celulare primare și cele stabile de la organismele sensibile își păstrează sensibilitatea la acțiunea toxinei, iar cele ce provin de la organisme rezistente își păstrează rezistența.

Exotoxina A produsă de Pseudomonas aeruginosa

Liniile toxigene de *P. aeruginosa* secretă exotoxina A, un factor proteic de virulență de 66 kD, cu un rol important în bacteriemiile consecutive arsurilor, în infecțiile pacienților imunodeficienți, precum și în infecțiile experimentale. Toxina este secretată sub forma unui lanț polipeptidic cu 4 punți S–S, fără activitate toxică (pretoxină). Activarea toxinei are loc fie în prezența agenților reducători, fie prin clivaj proteolitic. Fragmentul activ are 26 kD.

Exotoxina A are activitate enzimatică similară cu aceea a toxinei difterice: catalizează ribozilarea EF–2, dependentă de NAD. Forma inactivă (pretoxina) nu catalizează reacţia de ribozilare în sistemele acelulare, dar fiind preluată de celulele animale este degradată de enzimele lizosomale şi se eliberează fragmentul cu activitate enzimatică. Clivajul proteolitic poate să survină în timpul depozitării toxinei native, sau în timpul secreţiei sale în mediu, sub acţiunea proteazelor de *P. aeruginosa*.

Sinteza exotoxinei A de *P. aeruginosa*, ca şi a *toxinei difterice* este inhibată de adausul Fe în mediul de cultură. Cele două toxine nu se aseamănă structural şi nu au reactivitate imunologică încrucişată şi de aceea este surprinzător mecanismul lor similar de acţiune. Totuşi, unele linii celulare sunt sensibile la una dintre toxine şi rezistente la cealaltă (celulele de şoarece sunt rezistente la toxina difterică, dar sensibile la exotoxina A. Celulele umane se comportă invers). Diferenţele se explică pe seama receptorilor de toxine şi a mecanismelor de pătrundere în celulă.

Toxina dizenterică

Toxina dizenterică este un factor important al virulenţei în infecţiile produse de *S. dysenteriae*. Preparatul brut obţinut prin filtrarea mediului de creştere, ca şi lizatul celular au activitate *citotoxică* (evidenţiată pe celulele HeLa), *enterotoxică* (evidenţiată prin acumularea lichidului în ansa ileală, *in vitro*) şi *neurotoxică* (manifestată prin efect letal la şoarece, iepure, maimuţă). Toate aceste activităţi se datorează aceleiaşi proteine.

Citotoxina de *S. dysenteriae* este o exotoxină sintetizată în formă inactivă, de pretoxină. După clivarea proteolitică rezultă forma activă.

Molecula de toxină are g m de 65–68 kD şi constă din două componente:

- un lanţ greu (A), cu acţiune enzimatică, cu g m de 30 kD;
- un oligomer (B) format din 6–7 subunităţi, cu g m de 5 kD fiecare.

Lanţul A este sensibil la acţiunea tripsinei şi este scindat în două fragmente, A_1 şi A_2, care rămân legate printr-o punte S–S. Catenele A sau B izolate nu sunt toxice pentru celule, dar fragmentul A_1 este inhibitor al sintezei proteice în sistemele acelulare.

Molecula de toxină pătrunde în celulă prin endocitoză mediată de receptori glicoproteici. Efectul ei asupra sistemului celular este inhibiţia sintezei proteice, afectată la nivelul alungirii lanţului proteic: este inhibată etapa transferului aminoacizilor pe lanţul polipeptidic. Nu există dovezi în favoarea ribozilării EF–2. Efectul enterotoxic nu este însoţit de creşterea nivelului AMP-ciclic intracelular.

În unele cazuri, faza diareică a infecţiei cu *S. dysenteriae* este urmată de faza dizenterică, iniţiată prin invazia celulelor epiteliului colonic. Bacteriile se multiplică în celulele epiteliale şi secretă toxină al cărei efect este inhibiţia sintezei proteice şi eventual moartea celulară.

ENTEROTOXINE

Grupul enterotoxinelor este heterogen cu privire la talia şi structura moleculelor, la mecanismele lor de acţiune, dar au în comun efectele enteropatogene de intensitate şi durată variabile.

Enterotoxinele sunt produse de bacterii Gram pozitive (*S. aureus, C. perfringens, C. difficile, B. cereus*) şi Gram negative (enterotoxinele termostabile şi termolabile de *E. coli, S. typhimurium*, respectiv *K. pneumoniae*, toxina holerică, toxina shiga, toxina de *P. aeruginosa*).

Producerea enterotoxinelor a fost evidenţiată prin diferite metode:

– metoda ansei intestinale, la iepure sau cobai, ce constă în ligaturarea ileonului după injectarea toxinei sau a culturii bacteriene. În lumenul ansei se acumulează o cantitate variabilă de lichid, care se corelează direct cu intensitatea efectelor toxinei;

– injectarea intragastrică sau intestinală a diferitelor toxine;

– evaluarea efectului dermonecrotic după injectarea intradermică.

Utilizarea culturilor de celule a permis studiul mecanismelor de acţiune a toxinelor, în special a celor ce activează adenilat-ciclaza. Evaluarea efectelor enterotoxinelor asupra culturilor de celule a permis împărţirea lor în două subgrupe:

– enterotoxine *citotoxice* (toxina shiga, toxina *C. perfringens*) omoară celulele în cultură;

– enterotoxine *citotonice* (produse de *E. coli, V. cholerae*), activatoare ale adenilat-ciclazei şi care se reflectă în diferite activităţi celulare (stimularea steroidogenezei în celulele suprarenalei etc.).

Toxina holerică

Toxina holerică, secretată de *V. cholerae*, după ce agentul infecţios colonizează intestinul subţire este cauza holerei clinice. Celulele bacteriene aderă de mucoasa intestinală prin mecanisme necunoscute, deşi au fost implicate diferite structuri: o adezină flagelară şi hemaglutininele. Colonizarea intestinală cu *V. cholerae* nu implică penetrarea sa în celulele mucoasei şi nici apariţia leziunilor detectabile histologic.

Molecula de toxină este alcătuită din 7 subunităţi: A_1 (29 kD), A_2 (5,5 kD) şi 5 fragmente B (B_1-B_5, cu g m 11,5 kD fiecare) aşezate concentric în

jurul unui miez central format de subunitatea A_1. Subunitatea hidrofobă B se leagă de receptorii celulari (gangliozidul membranar $GM1_1$) şi îşi modifică configuraţia spaţială, formând un canal prin care subunitatea A_1 pătrunde în citoplasmă. Subunitatea A_2 are un rol nedefinit (probabil participă la internalizarea subunităţii A_1). Legarea toxinei holerice de gangliozide este similară legării tireotropinei de receptorul său pe celulele tiroidiene. Tireotropina are secvenţe omologe de aminoacizi cu toxina holerică. Circa 50 molecule de toxină sunt suficiente pentru a produce efectul, mediat de creşterea nivelului AMP ciclic intracelular.

Aproape toate liniile de culturi celulare sunt sensibile la acţiunea toxinei.

AMP ciclic rezultă prin acţiunea adenilat–ciclazei din stratul fosfolipidic intern al membranei citoplasmatice asupra ATP:

ATP → AMP – 3'–5' ciclic + PPi. Reacţia implică participarea NAD, GTP şi a proteinelor din citosol. Fragmentul A are activitate NAD–azică. După hidroliza enzimatică a NAD, toxina catalizează legarea ADP–ribozei de diferite proteine celulare, în special de proteine membranare, inclusiv de adenilat–ciclază. Ribozilarea adenilat-ciclazei determină creşterea de circa 6 ori a concentraţiei sale. Această creştere induce acumularea şi menţinerea în celulă a unor concentraţii foarte ridicate de AMP–ciclic. Efectul toxinei este mediat de NAD (un cofactor al ribozilării adenilat–ciclazei) şi de proteine reglatoare.

Creşterea nivelului celular al AMP–ciclic induce, pe de o parte, inhibiţia absorbţiei Na^+ şi a Cl^- din lumenul intestinal şi pe de altă parte, o excreţie

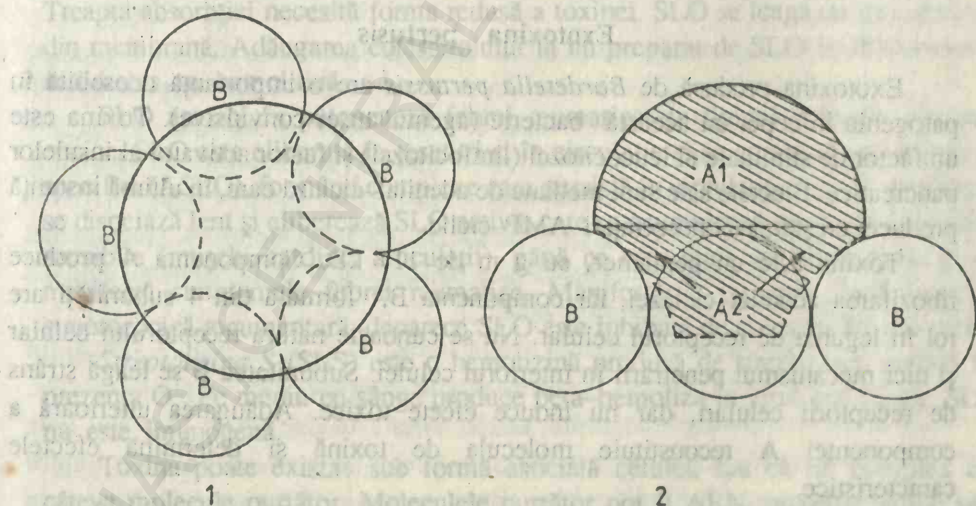


Fig. 61. Reprezentare diagramatică a aranjamentului spaţial al subunităţilor toxinei holerice (1 = reprezentare plană; 2 = reprezentare în spaţiu) (după van Heyningen, 1977).

masivă a Na^+, Cl^-, la care se adaugă K^+, bicaronatul de sodiu, apa şi glucoza, care se acumulează în lumen. Astfel, sistemul adenilat–ciclază–AMP–ciclic acţionează ca mediatori ai perturbării fluxului normal de ioni, apă, glucoză. Efectul letal al toxinei nu se datorează unor leziuni directe, detectabile, ci survine ca urmare a deshidratării şi a pierderii masive de ioni.

Enterotoxinele produse de E. coli

Liniile toxigene de *E. coli* produc majoritatea cazurilor de diaree la persoanele care călătoresc. Se disting două tipuri de enterotoxine: termolabilă şi termostabilă.

Enterotoxina *termolabilă (TL)* este foarte asemănătoare toxinei holerice, atât ca structură moleculară, cât şi ca mecanism de acţiune. Ea recunoaşte acelaşi receptor celular (gangliozida GM1) ca şi toxina holerică. Toxina activează adenilat–ciclaza prin ribozilare dependentă de NAD (ca şi toxina holerică) şi catalizează hidroliza NAD la ADP–riboză şi nicotinamidă.

Enterotoxina *termostabilă* (TS) produsă de *E. coli* are g m 2000 D şi nu manifestă reactivitate încrucişată cu enterotoxina TL. Liniile de *E. coli* producătoare de enterotoxină TS determină afecţiuni diareice la copii. Se cunosc variante antigenice distincte (TS_A şi TS_B), care nu dau reacţii încrucişate.

Nu se cunosc receptorii celulari pentru aceste toxine şi nu se ştie dacă, este necesară pătrunderea în celulă pentru a-şi exercita efectul, mediat de stimularea guanilat–ciclazei. (Middlebrook, 1984).

Exotoxina pertusis

Exotoxina produsă de *Bordetella pertussis* are o importanţă deosebită în patogenia infecţiei cu această bacterie (agentul tusei convulsive). Toxina este un factor de stimulare al leucocitozei (limfocitozei) şi factor activator al insulelor pancreatice. Efectele sale sunt mediate de adenilat–ciclază care, în ultimă instanţă produce creşterea concentraţiei AMP–ciclic.

Toxina este un pentamer, cu g m de 117 kD. Componenta A produce ribozilarea adenilat–ciclazei, iar componenta B, formată din 4 subunităţi are rol în legarea de receptorul celular. Nu se cunoaşte natura receptorului celular şi nici mecanismul penetrării în interiorul celulei. Subunitatea B se leagă strâns de receptorii celulari, dar nu induce efecte toxice. Adăugarea ulterioară a componentei A reconstituie molecula de toxină şi determină efectele caracteristice.

Toxina hidrolizează NAD la ADP–riboză şi nicotinamidă. Efectele ei sunt mediate de adenilat–ciclază. Creşterea concentraţiei sale implică o creştere

corespunzătoare a nivelului AMP–ciclic. Mecanismul molecular al producerii acestor modificări nu se cunoaşte, dar este diferit de acela al toxinei holerice.

Toxine streptococice

S. pyogenes produc numeroase tipuri de molecule extracelulare, dar rolul lor în patogeneză este puţin cunoscut. Cele mai cunoscute tipuri de molecule streptococice sunt streptolizina O (SLO) şi streptolizina S (SLS). Ele determină proprietăţile hemolitice şi citotoxice ale filtratelor de cultură. Efectele lor se produc asupra membranei plasmatice.

Cel mai important factor de virulenţă produs de *S. pyogenes* este proteina M, situată la exteriorul peretelui celular. Ea conferă specificitate antigenică de tip, streptococilor grupului A şi este chimiotactic negativă pentru fagocite. Este antigenică şi induce sinteza anticorpilor specifici cu efect opsonizant. Un alt factor de virulenţă este acidul hialuronic capsular, deasemenea cu efect protector faţă de fagocite.

SLO este produsă de toţi streptococii grupului A şi este prototipul toxinelor citolitice sensibile la acţiunea O_2, dar activate de grupările SH. Sunt produse de câteva bacterii Gram pozitive. Aceste toxine sunt înrudite antigenic. Activitatea lor este complet inhibată de concentraţii foarte mici de colesterol.

Cea mai caracteristică proprietate a SLO este activitatea hemolitică. Concentraţii foarte mici de SLO, la 37° produc liza eritrocitelor într-un interval de ordinul minutelor. Interacţiunea iniţială a SLO cu membrana celulară pare a fi reversibilă. Treapta absorbţiei necesită forma redusă a toxinei. SLO se leagă cu colesterolul din membrană. Adăugarea colesterolului la un preparat de SLO inhibă complet activitatea sa hemolitică.

SLO are rol în patogeneza febrei reumatice. În timpul infecţiei streptococice, SLO este eliberată în ţesuturi şi în circulaţie şi se combină cu anticorpii specifici (ASLO), formând complexe care persistă în circulaţie. Aceste complexe se disociază lent şi eliberează SLO activă, care se acumulează pe sau în ţesuturile sensibile (muşchi cardiac, articulaţii), până ce este atins un nivel toxic şi se manifestă simptomele febrei reumatice. Manifestările nu apar după infecţia streptococică tegumentară, deoarece SLO este inhibată de colesterolul din piele.

Streptolizina S (SLS) este o hemolizină produsă de streptococi, stabilă în prezenţa O_2. Pe mediu cu sânge produce beta–hemoliza în jurul coloniilor. SLS nu este imunogenă.

Toxina poate exista sub formă asociată celulei, sau ca un complex cu câteva molecule purtător. Moleculele purtător pot fi ARN, proteine serice sau *in vitro,* tween ori triton. Porţiunea hemolitică este un polipeptid, inactivat sub acţiunea papainei sau pronazei, care are 28 aminoacizi.

Moleculele care au rol de suport pentru SLS transferă polipeptidul de la un purtător la altul fără să-i modifice efectul litic. Dacă ARN-hemolizina este tratată cu RN–ază, activitatea hemolitică se pierde. Activitatea hemolitică este inactivată, distrugând fie componenta hemolitică fie purtătorul specific.

SLS legată de celulele de *Streptococcus* s-a evidențiat prin incubarea celulelor bacteriene cu eritrocitele, la 37°. Pentru ca liza să se producă este necesar contactul dintre celula bacteriană și eritrocit. SLS are acțiune citolitică pentru multe tipuri de celule eucariote, ca și pentru protoplaștii bacterieni. Activitatea citotoxică și efectele litice ale SLS sunt rezultatul interacțiunii cu fosfolipidele membranei celulare. Faptul că eritrocitele se umflă înainte de liză, denotă că hemoliza se face prin proces osmotic.

Toxina *eritrogenă* (scarlatinoasă) tip A este o proteină de 30,5 kD, cu o singură grupare SH/moleculă. Prin gruparea SH, toxina se leagă de alte molecule proteice sau de molecule mici. *In vitro* acționează ca mitogen nespecific, efect pe care îl conferă filtratului acelular de cultură streptococică. Toxina purificată este pirogenă pentru iepure și mărește sensibilitatea animalelor la șocul endotoxic. Diminuă titrul anticorpilor serici și a celulelor formatoare de plaje. După circa 10 zile, răspunsul imun se intensifică.

Toxine stafilococice

Testele hemolitice și serologice au relevat existența a 4 hemolizine; alfa, beta, gama, delta. Aceste toxine sunt distincte de leucocidină și enterotoxină.

Toxina alfa-hemolitică are și efecte letale și dermonecrotice. Este produsă de majoritatea liniilor de *S. aureus*. În preparatele purificate se prezintă sub formă polimeră din 6 subunități monomere, cu dispoziție inelară. Toxina alfa acționează asupra membranei celulare și îi mărește permeabilitatea. Hematiile de iepure sunt foarte sensibile, iar cele umane foarte puțin sensibile. Toxina alfa interacționează cu lipidele și astfel penetrează regiunea hidrofobă a membranei hematiei. Nu se cunoaște mecanismul său de acțiune: ar fi o acțiune enzimatică proteolitică sau una colesterilesterazică.

Toxina beta este o hemolizină activă la cald și la rece, asupra hematiilor de berbec, bovine, capră, om. Cele de iepure și cobai sunt relativ rezistente. Toxina beta este produsă de liniile de *S. aureus* izolate de la animale. Este o hemolizină foarte activă pe hematiile de berbec și necesită prezența ionilor de Mg^{2+}; (10^6 unități hemolitice/mg). Enzima este o fosfolipază C. Produsele hidrolizei sale sunt N-acilsfingozina și fosforilcolina. Studiul efectelor sale a înlesnit cunoașterea distribuției fosfolipidelor în membrana hematiei.

Compoziţia în aminoacizi a toxinei şi g. m. (30000) sunt similare cu acelea ale toxinei alfa. Toxina înalt purificată este letală pentru iepure, cobai, şoarece în doze de 10–100 µg.

Toxina gama este alcătuită din două componente cu acţiune sinergică, ambele necesare pentru efectul hemolitic şi toxic asupra şoarecelui. Cele două componente, cu g. m. 29000 şi respectiv 26000 sunt proteine cationice. Toxina este imunogenă şi *in vivo* se formează anticorpi neutralizanţi.

Toxina delta este o hemolizină a eritrocitelor unor specii de manifere. Din punct de vedere chimic este un polipepdid din care lipsesc histidina, arginina, prolina, tirozina şi cisteina. Este alcătuită din două componente cu puncte izoelectrice diferite.

Leucocidina are efect toxic asupra polimorfonuclearelor şi macrofagelor de iepure şi om. Molecula sa este alcătuită din două subunităţi: *F*(fast) şi *S*(slow), în raport cu migrarea lor pe coloane de carboximetil-celuloză. Separate, cele două componente sunt inactive. Acţiunea lor este sinergică asupra leucocitelor.

Enterotoxina stafilococică determină intoxicaţia alimentară stafilococică, prin ingestia unor produse care conţin enterotoxina preformată. Voma şi diareea sunt simptomele obişnuite. Sunt 6 variante antigenice ale enterotoxinei, cu specificitate serologică: A, B, C_1, C_2, D, E, cu g. m. între 28–35000. Enterotoxina acţionează asupra viscerelor abdominale, determinând descărcarea impulsurilor care ajung la centrul vomei prin nervul vag.

Exfoliatina stafilococică este o proteină (glicoproteină) cu g. m. 24000 termostabilă şi acidolabilă. Este produsă de liniile de *S. aureus* sensibile la grupul fagic 2. Toxina determină exfolierea tegumentului la om şi şoarece. Leziunile iniţiale sunt sterile, iar stafilococii se izolează din tractul respirator. Nu se cunoaşte modalitatea de transport a toxinei la locul viitoarei leziuni, deşi ruta sanguină nu este exclusă (Kapral, 1975).

În concluzie, exotoxinele bacteriene prezintă următoarele asemănări: 1) au o structură generală a moleculei după modelul unei subunităţi de legare de receptorul celular şi o subunitate care realizează activitatea specifică asupra ţintei celulare; 2) pătrunderea în celulă are loc pe calea endocitozei mediată de receptor; 3) activitatea enzimatică a ADP-ribozilării la nivelul biochimic.

Numeroşi alţi ligazi pătrund în celulă prin mecanismul endocitozei mediată de receptori. Receptorii s-au identificat a fi de natură glicoproteică pentru toxina difterică şi pentru toxina shiga. Moleculele exogene (liganzi) care interacţionează cu suprafaţa celulei prin receptori glicoproteici sunt transportate prin invaginarea membranei în vezicule tapetate cu clatrină.

În cazul toxinei holerice și tetanice, receptorii s-au identificat a fi glicolipide. Internalizarea ulterioară în celulă se realizează prin microinvaginări netapetate cu clatrină.

Este posibil ca toxinele a căror țintă celulară se află în citosol, să pătrundă în celulă după legarea de un receptor glicoproteic, iar toxinele ce acționează la nivelul feței citosolice a membranei plasmatice, să utilizeze un receptor glicolipidic.

Problema receptorilor celulari în general și a celor care leagă toxinele bacteriene (nespecifici, dar „uzurpați" funcțional de acestea) beneficiază de rezultatele superioare calitativ ale utilizării anticorpilor monoclonali față de moleculele receptor. Aceștia vor trebui să blocheze legarea toxinei și să protejeze celula de efectul toxic.

Anticorpii monoclonali față de receptorii celulari, dar și unii hormoni polipeptidici (insulina) ar putea fi folosiți pentru construirea unor molecule „hibride" cu subunitatea activă a exotoxinei. S-ar identifica mai ușor receptorii suprafeței celulare și modalitatea de internalizare precum și ținta celulară.

Toxinele bacteriene s-au dovedit a fi sonde moleculare remarcabile pentru explorarea structurii și funcției celulei eucariote.

ENDOTOXINELE LIPOPOLIZAHARIDICE

Termenul de *endotoxină* (Pffeifer, 1892) este impropriu deoarece lipopolizaharidele (LPS) sunt componente ale suprafeței celulei bacteriene Gram negative și pot fi eliberate. El este totuși folosit pentru că, spre deosebire de exotoxine semnifică asocierea LPS cu celula.

Factorul toxic al bacteriilor Gram negative a fost extras de Boivin și Mesrobeanu (1933). Ei au identificat complexul glico-lipidic cu antigenul somatic (O) al bacteriilor care formează colonii netede (S). Endotoxinele LPS sunt componente ale peretelui celular la toate bacteriile Gram negative patogene și se deosebesc de exotoxine prin următoarele proprietăți:

– sunt produse de bacteriile Gram negative (*Salmonella, E. coli, Y. pestis*);

– sunt componente structurale ale membranei externe a peretelui celular al bacteriilor Gram negative și sunt eliberate după dezintegrarea celulei;

– sunt relativ termo-stabile;

– sunt mai puțin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate;

– din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt macromolecule complexe care conțin fosfolipide și polizaharide;

– toxicitatea lor rezidă în fracția fosfolipidică;

– nu se denaturează și nu rezultă anatoxine.

Localizarea parietală, la suprafaţa celulei bacteriene permite izolarea endotoxinelor LPS prin diferite metode chimice:

– solubilizarea cu acid tricloracetic şi precipitare cu alcool;

– solubilizare cu amestec fenol-apă la 68° şi precipitare cu alcool;

– extracţie cu fenol-cloroform-eter de petrol.

Endotoxinele LPS reprezintă 25% din moleculele de suprafaţă ale celulei şi sunt esenţiale pentru integritatea membranei externe. Împreună cu proteinele şi fosfolipidele, LPS formează o barieră hidrofobă protectoare.

Structura chimică a moleculei de LPS

Molecula LPS este alcătuită dintr-un complex *poliozidic* şi o parte *lipidică*. De aici derivă proprietăţile amfipatice ale acestui agregat molecular, conferit de grupări polare hidrofile şi grupări apolare hidrofobe.

La microscopul electronic, filamentele LPS au o structură trilaminară, corespunzătoare celor două straturi poliozidice şi stratului lipidic.

Cele mai studiate şi cunoscute LPS sunt cele ale g. *Salmonella*, deoarece clasificarea speciilor sale (tabelul Kauffmann-White) se bazează pe specificităţile serologice ale antigenelor O şi H.

Din punct de vedere chimic, molecula LPS, după extracţia prin metoda fenol-apă cuprinde 3 regiuni distincte:

– regiune polizaharidică externă, ce conferă specificitate serologică antigenului O;

– un miez oligozaharidic intermediar (regiunea R);

– o regiune internă hidrofobă – lipidul A, prin care LPS se ancorează în membrana externă şi conferă calitatea de toxină moleculei de LPS.

Ultimele două regiuni ale moleculei (oligozaharidul regiunii R şi lipidul A) sunt relativ invariabile şi au constituienţi similari la diferite specii de bacterii Gram negative. Oligozaharidul „R" conferă o largă specificitate de gen, fiind comun tuturor speciilor de *Salmonella*.

Polizaharidul O este un polimer de unităţi oligozaharidice repetitive şi conferă specificitate serologică de grup, diferitelor variante antigenice de *Salmonella*. Unităţile oligozaharidice conţin 2–4 componente monozaharidice: D-manoză, D-galactoză, L-ramnoză, o dezoxihexoză, o didezoxihexoză. Didezoxihexozele sunt zaharuri care nu există libere în natură, dar intră frecvent în structura polizaharidului O al Enterobacteriaceelor şi au primit denumiri care derivă de la speciile de origine: abequoză, tiveloză, paratoză, colitoză.

Polizaharidul O conferă specificitate antigenică de grup. La *Salmonella* există peste 60 grupe antigenice O. Variaţia antigenică a polizaharidului O se amplifică pe următoarele căi:

– schimbări ale poziţiei legăturilor (de exemplu, 1–4 în loc de 1–6);

– configuraţii moleculare modificate;

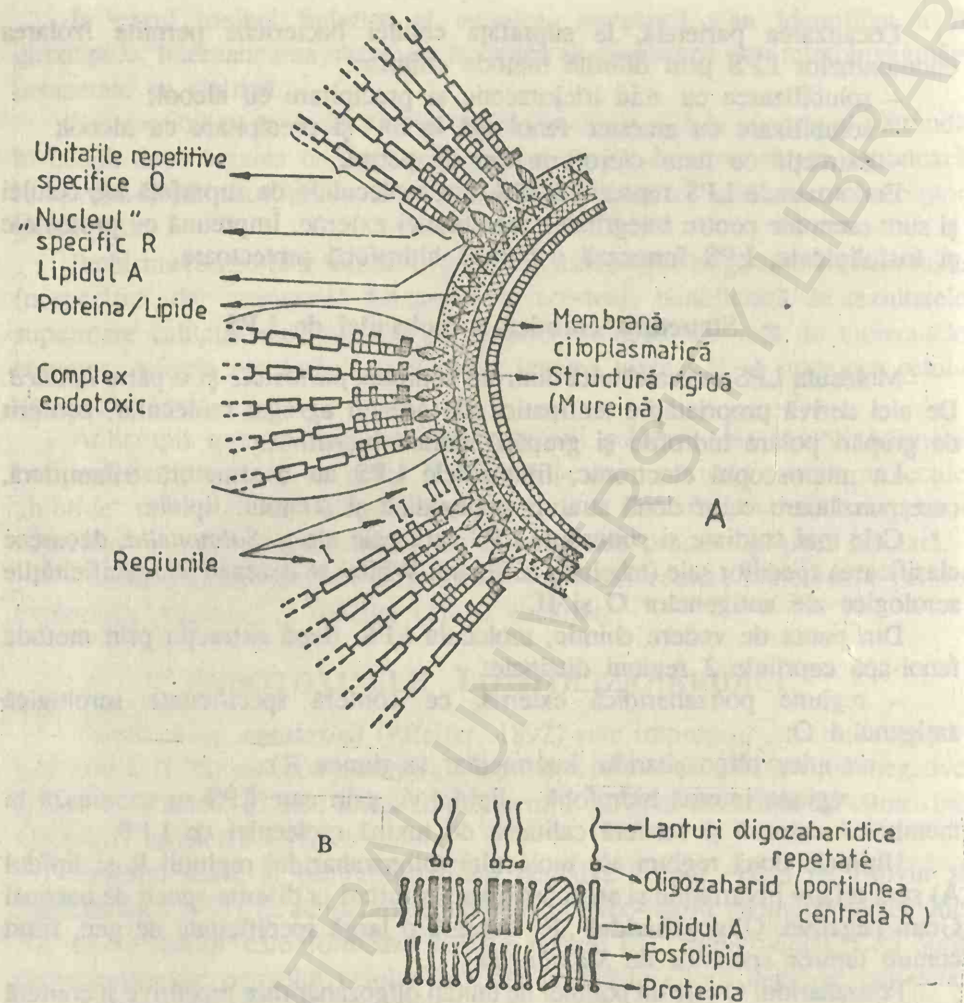


Fig. 62. A. Peretele celular de *Salmonella sp*., prezentând structura lipopolizaharidului. B. Detaliu care evidenţiază relaţiile lipopolizaharidului cu membrana externă a peretelui celular (după Westphal, 1974).

– înlocuiri la nivelul diferitelor subunităţi repetitive;

– deleţia sau substituţia unui monozaharid în subunităţile oligozaharidice.

Regiunea centrală a LPS („miezul" R) are o variabilitate chimică mult mai restrânsă şi conferă specificitate de gen. Miezul oligozaharidic este legat de lipidul A printr-un trizaharid, 2 ceto-3-dezoxioctonat (KDO).

Lipidul A este legat covalent de oligozaharidul „miezului" R. La *Salmonella*, lipidiul A este alcătuit din dizaharide de D-glucozamină legate

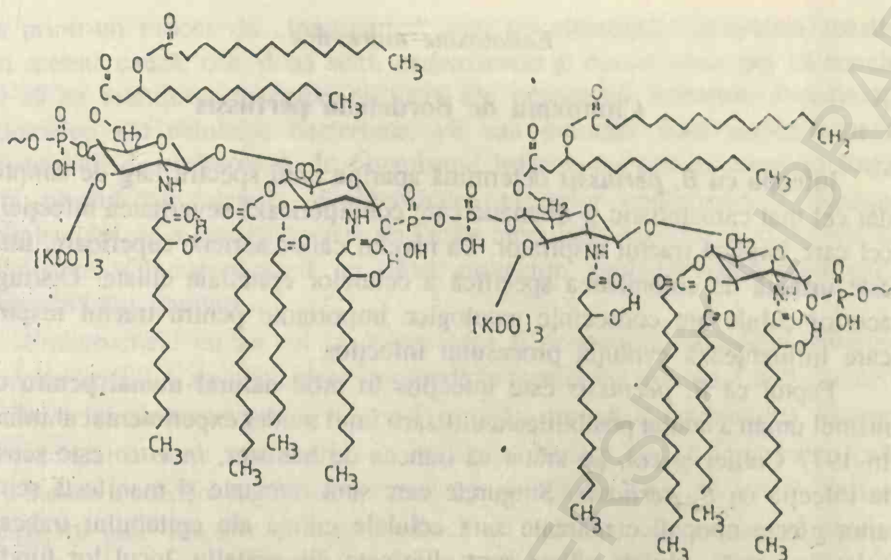


Fig. 63. Structura lipidului A din componenta lipopolizaharidică a celulei de Salmonella sp. (după Rietschel şi colab., 1975).

β 1–6, la rândul lor interconectate prin punţi pirofosforice. Grupările OH şi NH_2 ale glucozaminei sunt substituite de acizi graşi: lauric, palmitic, miristic.

Variantele care formează colonii R sintetizează o endotoxină incompletă, căreia îi lipseşte polizaharidul O, iar regiunea centrală are un conţinut scăzut de glucide.

LPS sunt molecule puternic imunogene. Anticorpii au specificitate faţă de polizaharidul O şi precipită LPS dar nu neutralizează efectele lor toxice. Răspunsul imun este de tip primar, cu sinteză prelungită de IgM, o cantitate minimă de IgG, chiar în absenţa limfocitelor T, deoarece LPS este un antigen timo-independent cu grupări antigenice repetitive.

Endotoxinele sintetizate de variantele coloniale R sunt mai puţin imunogene, datorită structurii lor mai simple. La rândul său, lipidul A are proprietăţi imunogene, iar anticorpii specifici reacţionează încrucişat cu lipidul A al altor endotoxine, datorită uniformităţii sale structurale. Antigenul polizaharidic (preparat prin hidroliză acidă) îşi păstrează proprietatea de specificitate, dar nu este imunogen (este o haptenă).

Lipidul A conferă proprietăţi endotoxice moleculei de LPS şi caracterul de termostabilitate.

Citotoxina de Bordetella pertussis

Infecţia cu *B. pertussis* determină apariţia unui spectru larg de simptome, dar cel mai caracteristic şi dramatic care condiţionează severitatea infecţiei este cel care implică tractul respirator. La nivelul căilor aeriene superioare, infecţia este urmată de colonizarea specifică a celulelor epiteliale ciliate. Distrugerea acestor celule are consecinţe patologice importante pentru tractul respirator, care influenţează evoluţia procesului infecţios.

Faptul că *B. pertussis* este infecţios în mod natural numai pentru organismul uman a anulat posibilitatea utilizării unui model experimental al infecţiei. În 1977 Collier şi col. au arătat că traheea de hamster, *in vitro* este sensibilă la infecţia cu *B. pertussis*. Singurele care sunt infectate şi manifestă semnele unor efecte citopatice marcate sunt celulele ciliate ale epiteliului traheal. În cele din urmă, celulele ciliate sunt eliminate din epiteliu, locul lor fiind luat de alte celule neciliate.

Simptomele şi evoluţia procesului patologic *in vivo*, la om argumentează în favoarea unei endotoxine cu efect pe termen lung: semnele clinice ale infecţiei nu se modifică dacă antibioticele sunt administrate după ce tusea paroxistică s-a declanşat, deşi bacteriile sunt eliminate.

Citotoxina traheală s-a purificat din mediul de cultivare al *B. pertussis* în fază logaritmică de creştere. Compoziţia chimică este foarte asemănătoare cu aceea a peptidoglicanului din structura peretelui bacteriilor Gram negative: acid muramic, acid diaminopimelic. Alte componente sunt alanina, acidul glutamic, glucozamina.

Neisseria gonorrhoeae, un patogen Gram negativ cu specificitate pentru mucoase se pare că realizează efectele patogene printr-o toxină similară. Dovada este indirectă: în faza logaritmică de creştere gonococii prezintă un turnover cu o rată înaltă a peptidoglicanului.

ENDOTOXINELE – MEDIATORI AI PATOGENIEI IN INFECŢIILE CU BACTERII GRAM NEGATIVE

Preparatul de endotoxină obţinut de la o linie patogenă de bacterii Gram negative reproduce experimental tabloul manifestărilor patologice ale infecţiei. Câinele şi iepurele sunt sensibile la endotoxină, în timp ce păsările şi animalele cu sânge rece sunt rezistente.

Efectele endotoxinei se manifestă atât în starea fizică legată de celulă, cât şi după ce este eliberată. Endotoxinele se eliberează prin moartea şi liza celulei

sau printr-un proces de „înmugurire" care nu afectează viabilitatea acesteia. Din această cauză, cele două stări, *endotoxemia* şi *bacteriemia* pot să coexiste sau să se manifeste în etape distincte ale procesului infecţios. Proprietăţile endotoxice ale celulelor bacteriene, vii sau omorâte sunt aceleaşi cu ale preparatului de endotoxină. În organismul infectat nu este o corelaţie lineară între nivelul bacteriemiei şi intensitatea efectelor endotoxice. Capacitatea organismului de a detoxifica este un factor modulator esenţial al manifestărilor endotoxice. Glucocorticoizii au efect protector, probabil prin modificarea permeabilităţii capilare.

Endotoxinele nu au rol în colonizarea şi penetrarea suprafeţei mucoase, deoarece lipidul A are o localizare profundă în membrana externă. Liniile invazive şi neinvazive ale aceleiaşi specii produc cantităţi similare de endotoxină. Singurul rol potenţial atribuit endotoxinei în iniţierea infecţiei constă în capacitatea sa de a induce o scădere trecătoare a capacităţii de apărare a gazdei, prin întârzierea declanşării unui răspuns inflamator. Dacă un inocul de *S. aureus* se asociază cu endotoxina, procesul infecţios evoluează rapid.

Dozele mici de endotoxină măresc reazistenţa organismului la infecţiile bacteriene şi virale prin stimularea activităţii fagocitare şi respectiv a producerii de interferon. Endotoxina măreşte rezistenţa la o doză letală de radiaţii, probabil prin stimularea diviziunii celulelor măduvei osoase.

Endotoxinele iniţiază calea alternă de activare a complementului. Se eliberează mediatorii leucotactici (anafilatoxinele), inductori ai procesului inflamator.

Endotoxinele stimulează celulele efectoare ale răspunsului imun humoral: limfocitele B şi macrofagele. *În vitro*, LPS au efect mitogenic asupra limfocitelor B, iar *in vivo*, LPS induc stimularea nespecifică, policlonală a lor. Stimulează răspunsul imun specific faţă de un antigen administrat simultan, având efect de *adjuvant*.

Spre deosebire de exotoxine, care au mecanisme specifice de acţiune la nivel celular, *în doze mari*, endotoxinele determină o varietate de manifestări patologice:

– *hipertermie* (febră), prin acţiunea lor asupra centrilor termoreglării, chiar după administrarea unor doze minimale;

– *leucopenie* urmată de leucocitoză. Efectul se exercită direct şi rapid asupra leucocitelor, care părăsesc patul vascular şi se retrag aproape instantaneu în plămâni şi în alte ţesuturi, în proporţie de circa 60%. După aproximativ 4 ore de la injectarea endotoxinei, numărul leucocitelor circulante creşte peste limitele normale. Creşte numărul hematiilor circulante, datorită eliberării în circulaţie

a rezervelor celulare din centrele de formare şi depozitare a celulelor sanguine;

– *modificări cardiovasculare:* legarea endotoxinei de celulele hepatice sau de alte celule induce eliberarea rapidă a aminelor biogene din depozitele celulare (histamină, serotonină) şi a peptidelor (bradikinină). Numărul plachetelor scade rapid. Aminele provoacă o hipertensiune trecătoare, urmată de hipotensiune severă, hipovolemie şi depozitarea intravasculară a fibrinei. Aceasta este rezultatul interacţiunii endotoxinei cu sistemul enzimatic de coagulare, cu cel fibrinolitic, cu cel de producere a kininelor şi cu sistemul complement. Endotoxina interacţionează cu factorul Hageman (factorul XII al sistemului de coagulare) şi îl activează. Astfel, sistemul coagulare–fibrinoliză este decompensat şi în vase are loc coagularea. Factorul XII activează factorul XI, iar acesta catalizează generarea trombinei şi formarea fibrinei. Factorul XII activează plasminogenul din care se formează plasmina, cu efect litic asupra fibrinei intravasculare. Plasmina activează componenta C1 a complementului, dar activează şi factorul XII. Acesta converteşte prekalikreina la forma sa activă din care rezultă kininele. Kininele activează factorul XII şi astfel efectele iniţiate de endotoxină sunt întreţinute şi amplificate;

– efecte *metabolice:* pierderea rezervelor de glicogen nu se datorează intensificării ratei metabolice, ci inhibiţiei sistemelor enzimatice ale gluconeogenezei şi ale sintezei glicogenului.

Din punct de vedere clinic dozele mari, de endotoxină produc următoarea succesiune de modificări: frison, febră, somnolenţă, dispnee, modificări ale tranzitului intestinal, diaree sanguinolentă, hiperglicemie iniţială, urmată de hipoglicemie, paralizie, comă, moarte. Aceste manifestări patologice se derulează în circa 24 ore după administrarea endotoxinei la animalele sănătoase şi corespund stării de *şoc endotoxic*. Starea de şoc este consecinţa *endotoxemiei*. Endotoxemia este rezultatul supraîncărcării celulelor cu rol de apărare, ca urmare a revărsării bacteriilor şi endotoxinelor în circulaţie. Starea de endotoxemie nu este totdeauna urmată de şoc şi moarte. La unii indivizi, instalarea ei nu este însoţită de manifestări clinice. Nu se cunosc cauzele acestor diferenţe mari de reactivitate şi răspuns la starea de endotoxemie. Şocul şi moartea sunt rezultatul interacţiunii endotoxinei cu unele componente ale sângelui, în primul rând cu sistemul de coagulare pe care îl activează şi îl amplifică. S-a emis ipoteza că instalarea şocului ireversibil este favorizată de absorbţia în sânge a endotoxinelor produse de microbiota intestinală. În mod normal, mecanismele de detoxifiere ale organismului sunt eficiente, dar starea de şoc se instalează consecutiv diverselor tulburări funcţionale ale organismului, care împiedică o reactivitate optimă faţă de infecţia cu bacterii Gram negative.

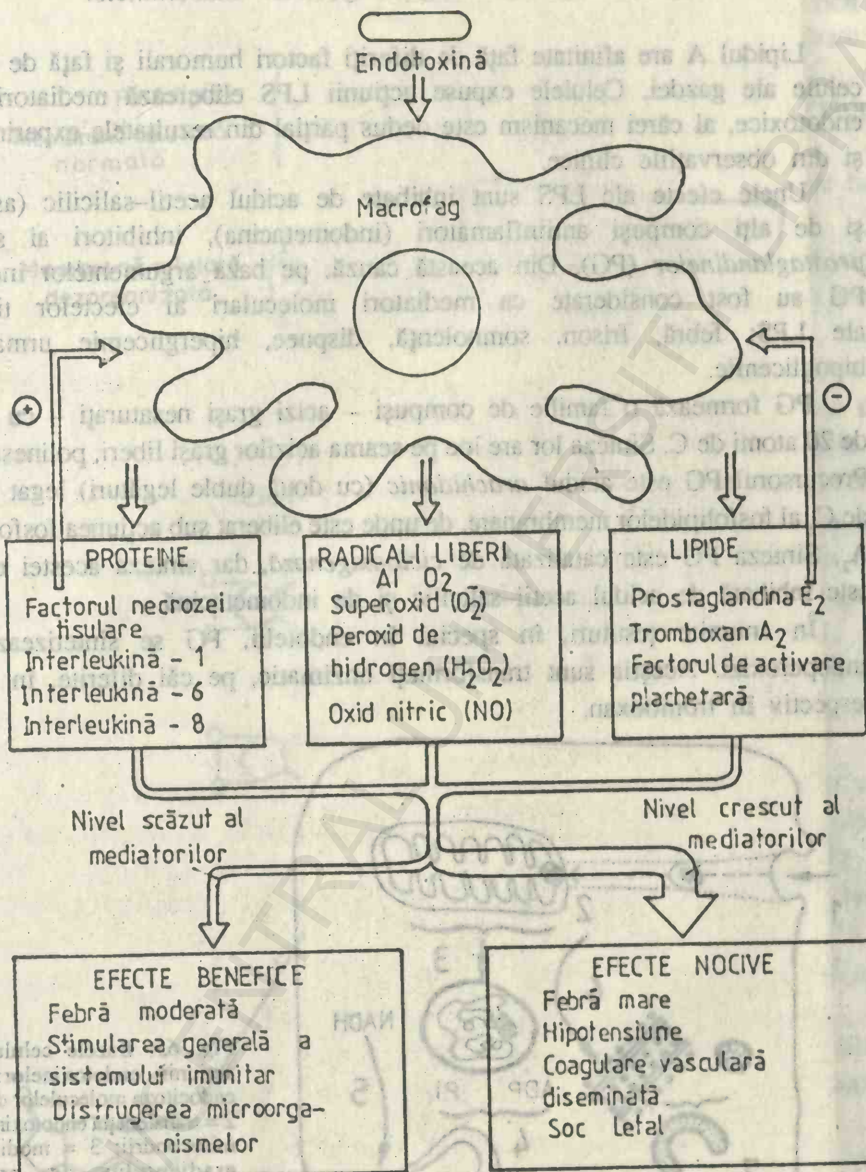


Fig. 64. Efectele endoxinelor. Endoxinele stimulează macrofagele să producă 3 grupe de mediatori: proteine, radicali liberi ai O_2 şi lipide. Aceşti mediatori acţionează independent, sinergic sau secvenţial, pentru a produce, în funcţie de doză, efecte benefice sau patologice. Factorul de necroză tisulară amplifică sinteza mediatorilor, iar prostaglandina E_2 o inhibă (după Rietschel şi Brade, 1992).

Lipidul A are afinitate faţă de diferiţi factori humorali şi faţă de diferite celule ale gazdei. Celulele expuse acţiunii LPS eliberează mediatorii stării endotoxice, al cărei mecanism este dedus parţial din rezultatele experimentale şi din observaţiile clinice.

Unele efecte ale LPS sunt inhibate de acidul acetil–salicilic (aspirină) şi de alţi compuşi antiinflamatori (indometacina), inhibitori ai sintezei *prostaglandinelor* (PG). Din această cauză, pe baza argumentelor indirecte, PG au fost considerate ca mediatori moleculari ai efectelor timpurii ale LPS: febră, frison, somnolenţă, dispnee, hiperglicemie urmată de hipoglicemie.

PG formează o familie de compuşi – acizi graşi nesaturaţi – cu catenă de 20 atomi de C. Sinteza lor are loc pe seama acizilor graşi liberi, polinesaturaţi. Precursorul PG este acidul *arachidonic* (cu două duble legături) legat esteric de C_2 al fosfolipidelor membranare, de unde este eliberat sub acţiunea fosfolipazei A_2. Sinteza PG este catalizată de *ciclooxigenază*, dar sinteza acestei enzime este inhibată de acidul acetil–salicilic şi de indometacină.

În anumite ţesuturi, în special în endotelii, PG se sintetizează din endoperoxizi. Aceştia sunt transformaţi enzimatic, pe căi diferite, în PG şi respectiv în tromboxan.

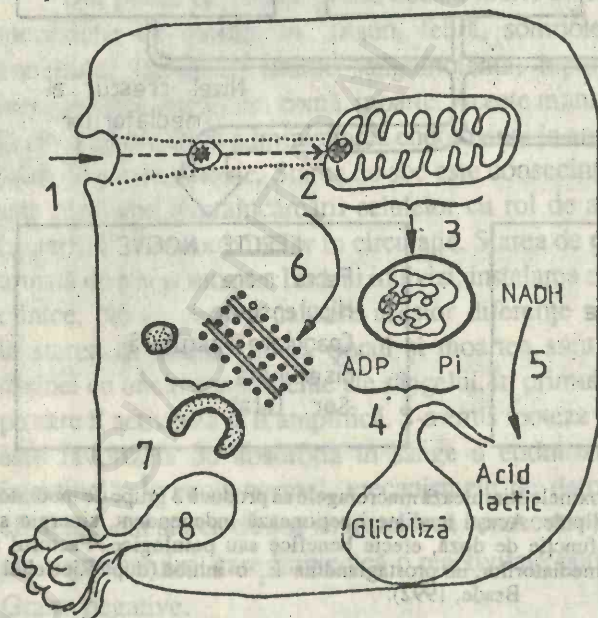


Fig. 65. Bazele celulare ale acţiunii endotoxinelor: 1 = endocitoza moleculelor de LPS; 2 = translocaţia endotoxinei spre mitocondrii; 3 = modificarea gradientului de protoni; 4 = acumularea ADP şi NADH în citosol; 5 = intensificarea glicolizei; 6 = inducerea enzimelor lizosomale; 7 = stimularea autofagiei; 8 = eliberarea hidrolazelor (după Bradley, 1981).

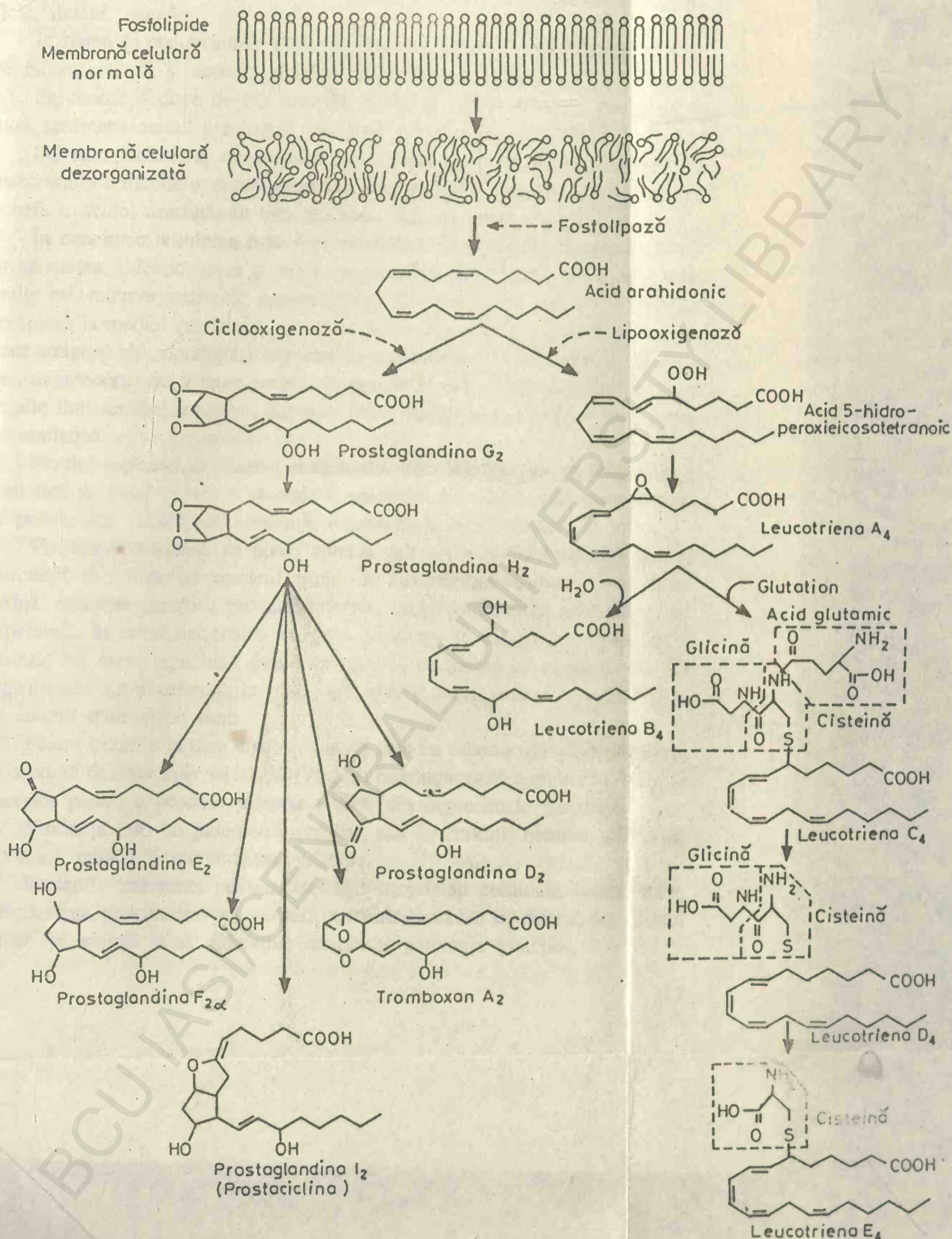


Fig. 66. Reprezentarea schematică a cascadelor enzimatice, care duc la sinteza prostaglandinelor şi leucotrienelor, mediatori ai efectelor endotoxice şi ai reacţiilor inflamatorii.

PG se sintetizează în majoritatea țesuturilor organismului uman și animal. Sursa celulară majoră de PG este reprezentată de macrofag, monocit și granulocite. După sinteză, PG sunt eliberate în circulație și sunt inactivate de ficat, rinichi, plămân.

În starea de endotoxemie, PG se produc atât prin intensificarea căii proprii de biosinteză, cât și datorită alterării metabolismului celular.

Se cunosc 4 clase de PG naturale: E, F, A, B. În structura lor de bază intră totdeauna acidul *prostanoic*, un acid gras cu 20 atomi de C.

PG sunt inbitori ai răspunsului imun indus de endotoxine. Ele diminuă reactivitatea limfocitelor și macrofagelor. Unii compuși ai acestei clase au efecte benefice: acidul arachidonic este protector față de șocul endotoxic.

În concluzie, virulența este o proprietate multifactorială, condiționată de invazivitatea, infecțiozitatea și toxigenitatea agentului infecțios. De cele mai multe ori, microorganismele patogene sunt foarte sofisticate în adaptările lor complexe la mediul gazdei. În acest sens se cunosc puține lucruri despre rolul unor antigene ale suprafeței bacteriene în patogeneză. De exemplu, unele linii de *Streptococcus* au o mare putere de invazie și produc bacteriemie, în timp ce alte linii nu sunt invazive, dar sunt foarte toxigene și produc forme grave de scarlatină.

Nivelul expresiei cantitative al factorilor de virulență variază independent unul față de altul. Pentru a produce o epidemie, o tulpină bacteriană trebuie să posede toți factorii de virulență, exprimați în grade variate.

Virulența bacteriană se poate aprecia sub raportul *infecțiozității* sau al *toxicității*, în funcție de numărul minim de bacterii sau cantitatea minimă de toxină, necesare pentru a produce infecția, respectiv moartea animalelor din experiență. În cazul bacteriilor toxigene, virulența se exprimă în *doza limită mortală 50*, care reprezintă cantitatea minimă de toxină ce omoară 50% din organismele din experiență, la o anumită specie, cu o greutate standard și la un anumit interval de timp.

Pentru cazurile în care efectul letal nu este un criteriu utilizabil, virulența se exprimă *în doza infecțioasă 50* (DI 50), care reprezintă numărul de bacterii necesare pentru a produce infecția a 50% din organismele inoculate.

Virulența este un parametru variabil, atât în condiții naturale cât și de laborator, putând fi pierdută prin mutație.

Bacteriile patogene, pe baza celor 3 proprietăți cumulate (agresivitate, infecțiozitate, toxigenitate) pot coloniza pe termen scurt sau îndelungat, organismul uman sau animal și să determine un proces patologic infecțios.

CONDIŢIILE DE APARIŢIE A PROCESULUI INFECŢIOS

Simpla prezenţă a unui microorganism patogen în mediul înconjurător nu este suficientă pentru a produce o infecţie la o gazdă sensibilă. Pentru iniţierea procesului infecţios sunt necesare următoarele condiţii obligatorii: existenţa unui *izvor de infecţie*, a unei *căi de eliminare* a agentului infecţios, a unei *căi de transmitere* şi a unei *porţi adecvate de intrare* în organismul sensibil. Domeniul specializat al bacteriologiei medicale care se ocupă cu studiul căilor de eliminare, transmitere şi pătrundere a agenţilor patogeni în organism se numeşte *epidemiologie*.

a) Izvorul de infecţie

Necesitatea existenţei *izvorului de infecţie* derivă din faptul că mediul extern (sol, apă, aer) este nefavorabil creşterii şi multiplicării majorităţii microorganismelor patogene. Mediul extern asigură, cel mult, condiţii de supravieţuire temporară. Perpetuarea microorganismelor în natură este condiţionată de existenţa unui *izvor* sau ***rezervor*** de infecţie care serveşte ca nişă naturală de viaţă şi de multiplicare. Aici se realizează procesul de acumulare naturală, de unde agentul patogen se poate răspândi la alţi indivizi sănătoşi pe care îi contaminează.

Izvorul de infecţie este diferit, în funcţie de agentul patogen şi de spectrul de gazdă al proceselor patologice pe care le produce. Unele microorganisme şi virusuri, în mod natural infectează numai gazdele animale şi produc *zoonoze*, omul fiind infectat în situaţii accidentale. Alteori, agenţii patogeni produc boli infecţioase (transmisibile) strict caracteristice omului (*antroponoze*) fără să infecteze organisme animale. În acest caz, omul reprezintă unicul izvor de infecţie în natură (pentru viroze – variola, varicela, oreionul, poliomielita, guturaiul, gripa, hepatitele, sau bacterioze – dizenteria, febra tifoidă, febrele paratifoide, tusea convulsivă, sifilisul, gonoreea, lepra). Pentru unele din aceste maladii infecţioase – lepra, sifilisul, variola, rujeola – omul bolnav este unicul rezervor natural al infecţiei. În alte cazuri (febra tifoidă, scarlatina, difteria, poliomielita, holera) agentul infecţios este transmis atât de omul bolnav, cât şi de cel sănătos, *purtător de agenţi patogeni*. Purtătorii sunt în unele cazuri, foşti bolnavi care s-au imunizat, nu mai prezintă nici un simptom clinic, dar păstrează în organism agentul patogen, temporar sau pentru totdeauna, pe care îl elimină în mediu. Purtătorii sunt deosebit de importanţi pentru diseminarea agenţilor patogeni în mediul extern, deoarece fiind aparent sănătoşi sunt greu de depistat şi se deplasează liber în colectivităţi, unde pot transmite boala la organismele receptive.

O altă categorie de boli infecţioase sunt comune omului şi animalelor şi sunt incluse în denumirea generică de *antropozoonoze*. Izvorul lor de infecţie este reprezentat de animale domestice sau sălbatice: câinele pentru rabie (turbare), febră butonoasă, leptospiroze; bovinele pentru salmoneloze, vaccină, bruceloze, tuberculoză, febră Q; şobolanul pentru salmoneloze, leptospiroze, febra muşcăturii de şobolan (sodoku), turbare, pestă (ciumă), tifos murin; păsările pentru encefalite virale, ornitoze, salmoneloze etc.

Controlul antropozoonozelor este foarte greu pentru că în circuitul agentului patogen intră animalele sălbatice. De exemplu, turbarea este răspândită la vulpe, veveriţă, liliac. De aici este transmisă la câine, iar de la câine la om. Chiar dacă incidenţa bolii scade după imunizarea câinilor (prin vaccinare), virusul nu se poate elimina din populaţiile de animale sălbatice.

Unele microorganisme patogene se dezvoltă în primul rând în mediile naturale (sol, apă) şi numai accidental infectează gazdele: sunt agenţii tetanosului şi gangrenei gazoase. Agentul se multiplică în sol şi pentru a se menţine nu trebuie transmis la o gazdă. Ele cauzează îmbolnăviri în mod cu totul accidental. Într-o situaţie similară se află *Clostridium botulinum*, care determină intoxicaţia alimentară – botulismul. Se dezvoltă numai în sol, de unde ajunge în conservele de legume, se multiplică şi produce toxină foarte puternică şi periculoasă dacă este ingerată.

b) Calea de eliminare a agenţilor patogeni

Agenţii patogeni care se multiplică în izvorul natural de infecţie sunt eliminaţi de la locul multiplicării şi pot să infecteze gazde noi. Calea de eliminare este condiţionată de localizarea lor specifică în organismul gazdă. Principalele căi de eliminare a agenţilor infecţioşi sunt calea intestinală şi cea respiratorie.

Calea intestinală este calea de eliminare a bacteriilor enterotrope, prin intermediul materiilor fecale, care pot conţine intermitent sau continuu, cantităţi mari de agenţi patogeni ai febrelor tifoide şi paratifoide, dizenteriei, holerei, ai toxiinfecţiilor alimentare, precum şi virusuri (virusul hepatitei epidemice, poliomielitei).

Calea respiratorie asigură răspândirea agenţilor patogeni ai infecţiilor respiratorii (difteria, tusea convulsivă, rujeola, variola, varicela, oreionul, gripa, guturaiul) prin intermediul secreţiilor nazofaringiene şi bucale, proiectate în timpul tusei, strănutului, vorbirii. Pe această cale, omul bolnav sau purtător răspândeşte în jur o pulbere fină de aerosoli constituiţi din picături microscopice

de secreţii încărcate cu agenţi patogeni. În timpul tusei şi strănutului, picăturile fine încărcate cu bacterii părăsesc cavitatea bucală cu o viteză de 200 mile/oră. Într-un strănut se pot elimina între 10000–100000 celule bacteriene. Bacteriile rezistente la uscăciune îşi păstrează viabilitatea pentru perioade lungi de timp, ataşate de particulele inerte.

În afara acestor căi principale, agenţii infecţioşi se mai pot elimina prin leziuni deschise – răni şi supuraţii (în cazul infecţiilor produse de stafilococi, streptococi, bacilul piocianic, gangrena gazoasă), pe cale urinară (febra tifoidă, leptospiroze, febra Q, tuberculoza renală), prin secreţia glandei mamare (bruceloză, tuberculoză, febră Q).

În cazul unor infecţii generalizate, care nu au poartă naturală de ieşire din organism, eliminarea agentului patogen se realizează prin intervenţia unui artropod hematofag, care suge sângele infectat (tifos exantematic, pestă, encefalite virale, paludism) sau în mod artificial, prin seringă sau instrumente chirurgicale (hepatită, sifilis).

c) Calea de transmitere a agenţilor infecţioşi

După ce au fost eliminaţi din organismul bolnav sau purtător, microorganismele patogene trebuie să fie transmise la o nouă gazdă receptivă. Transmiterea se realizează în mai multe modalităţi.

Transmiterea prin *contact direct* are loc în cazul în care, între organismul infectat şi cel receptor există o legătură strânsă, directă, fără participarea vreunui factor de mediu animat sau neanimat. Transmiterea prin contact direct se realizează: prin muşcătură (turbarea, febra muşcăturii de şobolan); prin supt (la animale febra Q, tuberculoza; la om tuberculoza, infecţiile cu piogeni); prin sărut (tuberculoza pulmonară, sifilisul); prin contact cutanat direct (boli de piele – dermatomicoze, furunculoza); prin contact sexual (când agentul cauzal este transmis prin căile genitale, infecţia se numeşte venerică – sifilisul, gonoreea).

În cele mai multe cazuri transmiterea infecţiei *este indirectă*, prin interpunerea mai mult sau mai puţin evidentă a unui factor de mediu neanimat denumit *vehicul* (lapte şi carne de la animalele bolnave – tuberculoza, febra, Q) sau a unui organism – denumit *vector* care se interpune între izvorul de infecţie şi organismul receptor. Iată câteva exemple de transmitere indirectă:

– transmiterea prin intermediul *obiectelor* folosite de un bolnav (veselă, rufe, îmbrăcăminte, cărţi, jucării etc.) este posibilă un timp limitat după contaminarea acestora, proporţional cu rezistenţa agenţilor patogeni la condiţiile de mediu. Astfel se transmite tuberculoza, difteria, scarlatina, variola;

– transmiterea prin *vectori* se realizează prin intermediul artropodelor, de cele mai multe ori hematofage (insecte, căpuşe), care preiau agenţii patogeni din izvorul natural şi îi transmit la o nouă gazdă, fie prin înţepătură, fie depunându-i pe tegumentul intact sau lezat. Uneori, vectorul acţionează numai ca purtător al microorganismului patogen (având numai rol mecanic), pe care îl transportă fie în tubul digestiv, fie pe suprafaţa corpului. Musca este vectorul mecanic pentru agentul patogen al febrei tifoide, al dizenteriei. Alteori, vectorul este el însuşi infectat şi realizează o transmitere *biologică*. În acest caz, după ce au ajuns în organismul vectorului, microorganismul sau virusul, fie numai se multiplică masiv (*Rickettsia prowazeki* – agentul tifosului exantematic, în corpul păduchelui), fie străbate o fază a ciclului său vital (sporozoidul *Plasmodium* – agentul patogen al malariei, în corpul ţânţarului). Flavivirusurile (arbovirusuri) se multiplică în organismul artropodelor, fără să producă boala sau avaria ţesuturilor. Transmiterea virusurilor la om, la alte mamifere sau la păsări se face prin înţepătura atropodelor. La rândul său, vectorul se infectează prin ingestia sângelui de la o gazdă viremică;

– transmiterea prin intermediul *aerului* se face prin inhalarea picăturilor septice, răspândite de un bolnav sau de un purtător de agenţi patogeni. Cele mai eficiente sunt picăturile septice foarte mici (nuclei), care pot rămâne în suspensie în aer (aerosoli), mult timp după eliminarea lor din organism. Astfel se transmite gripa, guturaiul, rujeola, rubeola, varicela, scarlatina, tusea convulsivă;

– transmiterea *hidrică* este proprie infecţiilor intestinale (febrele tifoidă şi paratifoidă, holera, hepatita, enteroviroze) şi leptospirozelor şi se produce prin contaminarea accidentală a unei surse de aprovizionare cu apă, cu agenţii patogeni proveniţi din dejecţii umane sau animale;

– transmiterea prin *alimente* (lapte, carne, ouă) are loc în cazul în care alimentele provin de la animale infectate, sau sunt contaminate prin manipularea de către o persoană (bolnavă sau purtătoare) care elimină agenţi patogeni. De regulă bacteriile patogene se multiplică în alimente, care sunt adevărate medii nutritive. Prin intermediul alimentelor contaminate se transmit agenţii febrei tifoide, ai toxiinfecţiilor alimentare (cu *Staphylococcus* şi *Salmonella*), ai febrei Q, ai infecţiei cărbunoase, ai botulismului;

– transmiterea prin intermediul *solului* are loc în cazul unor plăgi, de regulă adânci, în care au fost antrenate granule de sol. Astfel se transmit infecţiile cu *B. anthracis* (cărbunele), cu *Clostridium tetani* (tetanosul), agenţii gangrenei gazoase – *Welchia perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum.*

d) Poarta de intrare în organism

Pentru ca agenţii patogeni să determine o boală infecţioasă este necesar ca ei să învingă barierele naturale care se opun pătrunderii lor în organismul gazdei receptive. Poarta de intrare în organism corespunde, în general, căii prin care s-a făcut eliminarea agentului patogen din organismul infectat, fiind însă condiţionată şi de modul de transmitere a infecţiei.

De cele mai multe ori poarta de intrare în organism este reprezentată de: calea *respiratorie*, în infecţii ca oreionul, guturaiul, gripa, rujeola, variola, varicela, difteria, tusea convulsivă, scarlatina; *calea digestivă*, în infecţia cu agenţii febrei Q, ai hepatitelor infecţioase, poliomielitei; calea *cutanată*, pentru infecţia cărbunoasă, tularemie, febră Q, pentru infecţiile transmise prin muşcătură, prin înţepătura vectorilor, prin rănire.

Unii agenţi pătrund prin tegumentul intact, dar deobicei pătrunderea lor este condiţionată de existenţa unor leziuni infime (zgârieturi, înţepături de insecte, de acul seringii, răni deschise).

Unii agenţi patogeni pătrund în organismul receptiv pe mai multe căi, din care una este de obicei principală, dar determină aceleaşi manifestări indiferent de poarta de intrare.

Alţi agenţi patogeni produc maladii cu caractere clinice diferite în funcţie de poarta de intrare, *ca unic factor determinant* şi fără relaţie cu vreun caracter biologic particular al agentului patogen. De exemplu, *B. anthracis*, după pătrunderea pe cale tegumentară, determină cărbunele cutanat; după ingestia alimentelor contaminate provoacă un proces patologic intestinal; dacă infecţia are loc pe cale respiratorie, rezultatul este infecţia pulmonară gravă.

Infecţia. Tipuri de infecţii

Infecţia reprezintă totalitatea proceselor biologice care se desfăşoară în organismul animal sau uman, ca urmare a pătrunderii şi multiplicării agenţilor patogeni.

Pentru iniţierea procesului infecţios, agentul patogen trebuie să pătrundă în organism într-o doză suficientă, pe o cale adecvată, iar organismul să fie receptiv (să permită multiplicarea agentului infecţios). În concepţia modernă, procesul infecţios trebuie interpretat ca rezultat al interacţiunii dinamice dintre micro-şi macroorganism. Procesul infecţios reprezintă o reacţie a macroorganismului la acţiunea excitantului patologic complex, care este agentul patogen. În această concepţie ecologică, agentul infecţios este forţa motrice a procesului

infecţios, iar reactivitatea organismului condiţionează intensitatea, extinderea, gravitatea şi însăşi posibilitatea apariţiei procesului infecţios.

Ca regulă generală se poate afirma că procesul infecţios este specific, adică fiecare afecţiune de natură infecţioasă este produsă de un anumit agent patogen. Astfel, *C. diphteriae* este agentul difteriei, *C. tetani* – agentul tetanosului, *Brucella abortus* – cauza brucelozei, *Treponema pallidum* – agentul sifilisului. Se cunosc însă maladii infecţioase la care specificitatea este absentă. Rinichiul poate fi infectat de *E. coli, Streptococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa.* Toate acestea (şi altele) sunt agenţi cauzatori ai nefritei (nefro = rinichi; itis = inflamaţie). În acest caz, analiza simptomelor nu oferă indicii despre identitatea agentului cauzal. Situaţia este similară în cazul endocarditei, meningitei, pneumoniei, peritonitei.

Între cele două limite, a specificităţii stricte şi a lipsei totale de specificitate există situaţii intermediare, în care un organism patogen poate să inducă mai mult decât o afecţiune clinică. De exemplu, *M. tuberculosis* cauzează tuberculoza pulmonară, dar poate să determine infecţii ale pielii, oaselor şi ale organelor interne.

În 1878, R. Koch a stabilit criteriile, pe baza cărora se poate concluziona că un anumit microorganism este agentul etiologic al unei anumite maladii (postulatele lui Koch): 1) agentul patogen trebuie să fie prezent totdeauna în organismul bolnav; 2) agentul patogen să poată fi izolat şi cultivat *in vitro*, în culturi pure şi subcultivat în serie; 3) agentul izolat, după inoculare la un organism sănătos să reproducă maladia în forma clinică particulară şi să poată fi din nou izolat de la acesta, cu aceleaşi caractere.

Exigenţele postulatelor nu pot fi îndeplinite în totalitate, în toate cazurile de maladii infecţioase, dar rămân valabile ca un îndreptar pentru a stabili legătura cauzală dintre un agent patogen şi o anumită maladie infecţioasă. În unele cazuri (sifilis, lepră), agenţii nu se pot izola prin cultivare pe medii inerte. Ulterior s-au adăugat noi criterii: apariţia reacţiei serologice pozitive şi instalarea unei reactivităţi imune crescute.

În raport cu perioada de viaţă în care se face infecţia organismului uman şi animal există 4 tipuri de infecţie.

a) Infecţia *germinală* se produce în cazurile în care ovulul sau spermatozoidul sunt purtătorii agentului infecţios, pe care-l transmit celulei-ou (pe verticală) odată cu caracterele ereditare. Acest mecanism de infecţie nu s-a demonstrat la om şi nici la animalele superioare. A fost descris la artropode

(căpuşe din g. *Ornithodorus, Dermacentor, Rhipicephalus*), infectate astfel cu bacteria spiralată *Borrelia recurentis,* agentul patogen al febrei recurente de căpuşe. Ele devin astfel rezervoare naturale de infecţie.

b) Infecţia *transplacentară* (intrauterină) este demonstrată şi la om. Uneori este condiţionată de producerea prealabilă a unor leziuni placentare sub acţiunea agentului patogen, ca de exemplu, *T. pallidum, Brucella, C. burnetii* (agentul febrei Q). Alteori, infecţia are loc fără modificări placentare (infecţia variolică, rujeolică, hepatică etc.).

c) Infecţia *intrapartum* are loc în timp ce fătul traversează căile genitale (la expulzie), cu microorganisme patogene ale tractului genital matern (oftalmia şi conjunctivita gonococică a noilor născuţi).

d) Infecţia *postpartum* se produce după naştere. În această categorie sunt cuprinse majoritatea infecţiilor omului şi animalelor. Ele se manifestă în special după epuizarea imunităţii pasive, conferită de transferul anticorpilor materni, prin placentă şi colostru.

În raport cu *originea* microorganismelor care le produc, infecţiile sunt de două categorii:

– *exogene*, provocate de microorganisme care pătrund pe o cale adecvată;

– *endogene*, provocate de microorganisme autohtone (indigene), potenţial patogene ale microbiotei normale, datorită scăderii rezistenţei locale sau generale a gazdei, după iradiere, tratamentul cu medicamente citotoxice, hormoni corticosterozi, malnutriţie, obstrucţia căilor de excreţie. Aceste infecţii nu induc un răspuns imun detectabil clinic. Au tendinţa să revină ciclic sau să evolueze lent.

Colonizarea. După pătrunderea în organismul gazdă, la nivelul porţii de intrare începe multiplicarea sau *colonizarea* agentului infecţios. Multiplicarea realizează condiţia cantitativă obligatorie a procesului infecţios, deoarece în mod obişnuit, numărul bacteriilor sau virusurilor contaminate este prea mic pentru a iniţia imediat procesul infecţios. Cu cât tulpina este mai patogenă, cu atât numărul de celule, necesar iniţierii infecţiei este mai mic.

Din punct de vedere microbiologic, starea caracteristică a organismului infectat cu un agent patogen, înainte de declanşarea simptomelor este aceea de *contaminare*.

Consecinţă directă a colonizării (multiplicării) agentului patogen la poarta de intrare, local se constituie un *focar de inflamaţie,* adică o reacţie de apărare locală a organismului, cu mobilizarea şi aglomerarea leucocitelor. Rezultatul inflamaţiei este a *supuraţie* (formare de puroi). Supuraţia are loc la nivel cutanat şi la nivelul mucoaselor respiratorie, digestivă, urinară, genitală.

Modalitățile de manifestare a patologiei infecțioase

În funcție de natura agentului patogen, de preponderența unuia sau altuia dintre factorii de virulență, patologia infecțioasă se produce pe următoarele căi:

– *Intoxicația* de natură bacteriană, fără infecție este o situație de excepție, în cazul botulismului. *C. botulinum* se multiplică în alimentele conservate și produce toxină. Consumul unor astfel de alimente determină intoxicația;

– *Toxiinfecțiile* sunt procese alterative produse de bacteriile care se multiplică la poarta de intrare și eliberează toxine difuzibile în organism. De exemplu, *C. tetani* se multiplică în plaga anaerobă (provocată de rănire), iar toxina tetanică ajunge prin difuzie axonală retrogradă, la motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei, unde își exercită efectul. În mod asemănător, *C. diphteriae* se multiplică la nivelul mucoasei faringiene. Toxina, transportată de torentul sanguin produce efecte patologice la distanță, asupra fibrei musculare cardiace, celulei nervoase, a glandelor suprarenale etc.

– *Toxiinfecțiile alimentare* sunt rezultatul consumului alimentelor infectate (carne, lapte, ouă), provenite de la animale bolnave sau contaminate în timpul manipulării. De exemplu, *Salmonella*, sp. și *S. aureus* se multiplică excesiv în alimente (carne) și concomitent se acumulează endotoxine și respectiv enterotoxine (precum și cataboliți). Consumul unor astfel de alimente echivalează cu ingestia culturii bacteriene. Concomitent se manifestă efectele toxinelor preformate, precum și procesul infecțios inițiat de celulele vii ingerate;

– *Infecția locală* (neinvazivă) este produsă de agenții patogeni care, de obicei rămân localizați la poarta de intrare în cursul întregului proces infecțios. Dacă sintetizează toxine, acestea se răspândesc, pe cale sanguină, în tot organismul (*C. diphteriae*, *C. tetani*). În aceste cazuri, infecția locală are caracterul unei toxiinfecții. O formă particulară a infecției locale este *infecția de focar*. Aceasta este însoțită de o reacție inflamatorie minimă la nivelul focarului inițial, dar se exprimă prin fenomene morbide la distanță, mediate de componente elaborate de bacteriile cantonate la nivelul focarului inițial. Maladia reumatismală este considerată ca infecție tipică „de focar", în cursul căreia, streptococul localizat la poarta de intrare (amigdale) elimină substanțe cu efect alterativ și alergizant;

– *Infecțiile invazive* sunt acelea care, după o perioadă inițială de multiplicare la poarta de intrare, agenții infecțioși se răspândesc în organism pe diferite căi;

– prin *contiguitate*, în cazul agenților infecțioși cu multiplicare intracelulară (virusuri, rickettsii). După eliberare, prin necroza celulei, prin înmugurire, prin

permeabilizarea sau ruperea membranei, agenţii infecţioşi se fixează şi pătrund în celulele sensibile învecinate;

– prin *continuitate*, în cazul agenţilor patogeni care se multiplică într-un ţesut prevăzut cu un sistem canalicular preexistent. Diseminarea se face din aproape în aproape: agenţii patogeni care produc infecţii respiratorii progresează spre bronhii (şi produc bronşite), spre ţesutul pulmonar (produc pneumonii) sau spre pleură (produc pleurite); procesele inflamatorii la nivelul apendicelui generează peritonite; infecţiile căilor urogenitale şi biliare. La nivelul acestor canale, agentul infecţios întâlneşte o rezistenţă minimă, conferită de scurgerea secreţiilor şi de unele manifestări de mobilitate locală, orientată în sens opus progresiei infecţiei;

– pe cale *limfatică*. Agenţii infecţioşi sunt preluaţi de curentul limfatic, de la nivelul focarului primar (suprafaţa mucoaselor). Consecinţa imediată este inflamarea vaselor limfatice şi a ganglionilor regionali (limfadenită). Infecţia poate să progreseze până la vărsarea limfei în sânge şi rezultatul este *bacteriemia* sau viremia. Trecerea bacteriilor în sânge, facilitată de lezarea prealabilă a pereţilor vasculari se poate realiza direct din ţesutul infectat, la nivelul capilarelor.

Bacteriemia semnifică prezenţa unui număr mic de bacterii în torentul circulator, pentru o perioadă strict limitată de timp. Sistemele de apărare (în special sistemul fagocitar) elimină bacteriile circulante. Bacteriemia este consecutivă proceselor infecţioase acute pulmonare, intervenţiilor chirurgicale, extracţiei dentare, absorbţiei intestinale şi chiar periajului dentar. În sângele circulant, de obicei, bacteriile nu se multiplică. De aceea, prezenţa lor în sânge semnifică o eliberare dintr-un focar de infecţie, atât de abundentă, încât, temporar depăşeşte capacitatea protectoare a mecanismelor de apărare a organismului.

Uneori infecţia localizată este o caracteristică distinctă a microorganismelor lipsite de invazivitate. Faţă de orice tip de infecţie, organismul se apără prin intermediul barierelor mecanice, enzimatice şi imunitare. În funcţie de eficienţa forţelor de apărare, infecţia invazivă va rămâne *localizată* sau se va *generaliza*.

Extinderea infecţiei pe una din căile menţionate poate determina, fie o infecţie *regională*, care corespunde extinderii infecţiei (diseminării) pe teritorii întinse (de exemplu, sistemul limfatic regional şi eventual vasele sanguine tributare zonei), fie o infecţie *generalizată*.

Dintr-o infecţie regională, agenţii patogeni diseminaţi pe o cale adecvată pot dobândi localizări *secundare*, în orice ţesut sau organ, unde iniţiază noi

focare infecţioase. Aceste localizări pot fi unice (de exemplu, pe valvulele cardiace, în plămâni, în meninge, în ficat, în vezica biliară, în creier, în rinichi etc.) sau *multiple* (miliare) denumite *septicopioemii*. Infecţiile secundare cu localizări multiple evoluează spre infecţii generalizate.

Infecţiile generalizate sunt diseminate pe cale sanguină. Ele sunt precedate de trecerea masivă a bacteriilor dintr-un focar infecţios, în sânge. Prin numărul lor mare, bacteriile depăşesc capacitatea de apărare a organismului. Existenţa stabilă a unui număr mare de bacterii în sânge caracterizează infecţia *septicemică*. Septicemia este consecinţa descărcării masive de bacterii dintr-un focar de infecţie, vascularizat. Starea septicemică poate fi însoţită de toxemie, ca urmare a difuziei toxinelor din focar (abces, meningită).

Septicemia, consecutivă revărsării microorganismelor dintr-un focar semnifică incapacitatea mijloacelor de apărare ale gazdei de a reacţiona eficient faţă de agentul infecţios. Cu rare excepţii, (bacilul cărbunos, bacilul pestei), bacteriile nu se multiplică în sânge.

Uneori, faza septicemică nu este precedată de multiplicarea agentului patogen la poarta de intrare. Agenţii patogeni ai infecţiilor transmise de insectele hematofage (tifos exeantematic, febră recurentă) sau prin muşcătură (leptospiroze) străbat mucoasele şi trec direct în sânge.

Infecţia bacteriană produce modificări de tip alterativ ale organismului gazdă. Ele sunt *primare* (directe), datorate factorilor de patogenitate bacteriană (intoxicaţii, toxiinfecţii, bacteriemii) şi *secundare*, mediate de factorii umorali şi celulari ai sistemului imunitar (stările de hipersensibilitate).

Posibilităţi de evoluţie a procesului infecţios

Infecţia poate evolua în două modalităţi: *inaparent* sau *aparent*, ca boală infecţioasă.

Infecţia *inaparentă* caracterizează acele situaţii în care procesul infecţios nu se exteriorizează prin simptomatologie clinică. Nu se produce o stare maladivă, dar reacţiile imune devin pozitive. De exemplu, infecţia tuberculoasă inaparentă se detectează prin reacţia de hipersensibilitate întârziată la tuberculină. Reacţia este pozitivă la un procent mare de indivizi, dar maladia tuberculoasă clinică se manifestă la un mic procent din persoanele pozitive pentru testul tuberculinei. De cele mai multe ori, infecţiile inaparente se detectează prin reacţii serologice *in vitro* sau prin reacţii de hipersensibilitate *in vivo*.

Uneori, infecţia asimptomatică poate fi mortală. De exemplu, după inocularea intranazală la iepure, a unei culturi foarte virulente de pneumococ, moartea survine fără apariţia prealabilă a manifestărilor patologice. Explicaţia constă în paralizia mecanismelor de apărare ale gazdei.

Infecţia *aparentă* este aceea care se manifestă printr-un ansamblu de semne clinice obiective şi subiective, specifice şi nespecifice, consecinţe ale alterărilor produse de agentul infecţios şi de produsele activităţii sale.

Maladia infecţioasă prezintă următoarele caracteristici: a) este produsă de microorganisme vii sau de toxine ale microorganismelor; b) poate realiza o imunitate specifică de durată variabilă; c) organismul bolnav poate deveni sursă de îmbolnăvire a indivizilor sănătoşi; d) este specifică, în sensul că aceiaşi boală este produsă totdeauna de acelaşi agent cauzal, deşi ca formă clinică se poate prezenta sub aspecte variate.

Etapele maladiei infecţioase

În evoluţia sa, procesul infecţios aparent parcurge mai multe etape distincte, separate în timp.

Perioada de incubaţie sau perioada iniţială a infecţiei este intervalul de timp scurs între momentul pătrunderii agentului patogen în organism şi acela al debutului maladiei. Această perioadă nu este marcată de vreun simptom clinic evident. Durata ei variază între anumite limite, în funcţie de natura agentului patogen, iar pentru acelaşi agent, în raport cu doza infectantă, cu virulenţa agentului patogen şi cu reactivitatea organismului gazdă. Această perioadă este de maximă activitate a agentului patogen: se multiplică, se localizează la nivelul ţesutului receptiv şi eventual elaborează substanţe toxice.

Durata incubaţiei se măsoară în zile, săptămâni, luni, sau este foarte scurtă, de ordinul orelor. Pentru infecţiile *exogene* – produse de agenţi patogeni care nu fac parte din microbiota rezidentă a organismului, se poate determina relativ precis durata acestei perioade, prin infecţia experimentală a animalelor de laborator sau a voluntarilor umani. Pentru infecţiile *endogene* – acelea iniţiate de microorganisme din microbiota rezidentă a organismului, perioada de incubaţie nu se poate determina. Din momentul contaminării este posibilă scurgerea unei perioade foarte lungi de timp până când microorganismul poate să iniţieze un proces infecţios. Este cazul bacteriilor *oportuniste* sau *condiţionat patogene*.

Cel mai adesea agenţii infecţioşi manifestă un *organoptropism* evident, legat de faptul că, în general, fiecare specie îşi găseşte condiţiile optime de dezvoltare într-un anumit ţesut. Astfel, indiferent de calea de pătrundere în organism, vibrionul holeric se localizează în intestinul subţire, bacilul dizenteric (*S. dyzenteriae*), în peretele intestinului gros, *Brucella* – în placenta bovinelor, ovinelor, datorită concentraţiei mari de eritrol (dar nu în placenta umană), *Rickettsia prowazekii* – în celulele epiteliale ale capilarelor sistemului nervos central, *B. pertusis* – exclusiv în mucoasa bronşică.

B. anthracis se multiplică în orice ţesut, chiar şi în sânge.

Uneori, în evoluţia maladiei infecţioase se poate interpune perioada *prodromală*. Ea urmează incubaţiei şi durează până la apariţia primelor simptome caracteristice maladiei. Această perioadă se exteriorizează prin semne nespecifice: astenie, indispoziţie.

Debutul bolii este marcat de momentul în care numărul de bacterii şi cantitatea de toxine acumulate au atins un nivel critic. Debutul poate fi brusc sau lent şi este caracterizat din punct de vedere clinic, prin instalarea (bruscă sau gradată) a semnelor bolii: febră, cefalee, frisoane, algii musculo-articulare. Debutul marchează începutul perioadei de invazie a agentului infecţios de la locul multiplicării primare, sau a eliberării unei cantităţi prag de toxină, spre noi zone sensibile, iar din punct de vedere cronologic şi clinic semnifică începutul *perioadei de stare*.

Perioada de stare este intervalul de timp, în care maladiile infecto-contagioase îşi desfăşoară un tablou clinic cu simptome caracteristice, de amplitudine maximă, decisivă pentru evoluţia ulterioară. În această perioadă poate să survină decesul.

La sfârşitul perioadei de stare, simptomele dispar *brusc* – în crisis – (de exemplu, în pneumonia bacteriană), însoţită de sterilizarea bacteriologică, sau *lent* – in lysis (în cazul febrei tifoide). Organismul se poate steriliza, sau poate să rămână infectat pentru o perioadă nedefinită de timp.

In perioada *de stare*, organismul se imunizează abundent cu antigene bacteriene sau virale şi se sintetizează anticorpi. Imunizarea are, de regulă, ca rezultat, sterilizarea bacteriologică sau virologică a organismului (eliminarea completă a agentului infecţios). Uneori, organismul nu se sterilizează. În focarele de infecţie greu accesibile efectorilor răspunsului imun, agentul persistă, consecinţa fiind a *infecţie cronică*.

Convalescenţa este perioada de timp în care organismul îşi reface potenţialul de activitate, anterior îmbolnăvirii.

Infecţia cronică corespunde unei stări de echilibru între agentul infecţios şi organismul gazdă, caracterizată prin faptul că vindecarea clinică (dispariţia simptomelor) nu este însoţită de sterilizarea organismului. Focarele de infecţie cronică au localizări greu accesibile factorilor de apărare a organismului sau medicaţiei: în peretele arterelor mari, în sistemul nervos central, în viscerele parenhimatoase (ficat, rinichi, splină), în sinusurile osoase, în glandele bine încapsulate (prostata). Infecţia cronică poate să persiste fără simptome clinice (sifilisul latent) sau poate evolua cu reacutizări intermitente la diferite perioade de timp (bruceloză, tuberculoză, sifilis terţiar).

Starea de purtător este, fie consecinţa unei infecţii cronice, fie a persistenţei, pentru o perioadă de timp, a unui focar de infecţie, în organismele clinic sănătoase. Uneori, foştii bolnavi tolerează la nivelul mucoaselor (respiratorie, digestivă, urinară), agentul patogen, pe care-l elimină timp de câteva săptămâni (*S. pyogenes, C. dipheriae, V. cholerae*). În alte cazuri, microorganismele şi virusurile sunt eliminate pentru perioade îndelungate (ani): *S. typhimurium* rămâne localizată în vezica biliară, de unde se elimină intermitent. Purtătorii creează probleme dificile din punct de vedere epidemiologic, deoarece reprezintă un izvor de infecţie greu de depistat. Bolnavii de difterie pot rămâne purtători ai bacilului *C. diphteriae*. Starea de purtător de *S. typhi* poate să dureze zeci de ani. Purtătorii sunt foarte periculoşi pentru sănătatea publică, mai ales dacă vin în contact cu alimentele, ca manipulatori sau preparatori ai acestora.

Tipuri de evoluţie epidemiologică a infecţiei

Din punct de vedere epidemiologic, maladia infecţioasă poate evolua pe mai multe nivele de extindere spaţio-temporală şi incidentală:

– evoluţia *sporadică* semnifică apariţia cazurilor izolate de îmbolnăvire, atât în timp cât şi în spaţiu;

– evoluţia *endemică* este definită prin apariţia cazurilor relativ rare de infecţie, care se menţin constante numeric într-o colectivitate şi apar cu relativă regularitate, de obicei sezonier, la intervale variabile de timp. Majoriatatea indivizilor populaţiei sunt imunizaţi şi deci indemni faţă de agentul infecţios;

– evoluţia *epidemică* caracterizează evoluţia rapidă a unei infecţii, într-un interval scurt de timp, cu un număr mare de îmbolnăviri într-o colectivitate de mărime diferită (cămin, cazarmă, sat, regiune, ţară). Se cunosc epidemiile de ciumă, gripă, rujeolă, scarlatină;

– evoluția *pandemică* este aceea în care maladia infecțioasă se extinde foarte rapid pe un teritoriu foarte larg, cu cazuri foarte numeroase de îmbolnăvire (țări, continente). Evoluția pandemică este caracteristică infecției gripale și este facilitată de mijloacele de deplasare rapidă, la distanțe foarte mari.

Față de un agent patogen, absent în mod obișnuit dintr-un areal, populația poate fi foarte susceptibilă. La primul contact cu populația receptivă, agentul patogen declanșează o epidemie explozivă, dar odată cu instalarea stării de imunitate specifică a populației, incidența maladiei scade.

Dacă agentul își modifică specificitatea antigenică, epidemia evoluează și într-o populație imunizată, deoarece față de noile variante antigenice, populația nu posedă anticorpi specifici.

Epidemiile sunt condiționate de standardul de viață al comunității. Maladia tuberculoasă este o reflectare a acestei condiții, în timp ce bolile venerice sunt favorizate de promiscuitatea sexuală.

Capitolul VII

MECANISME DE APĂRARE ANTIINFECŢIOASĂ

IMUNITATEA ANTIINFECŢIOASĂ

Răspunsul imun faţă de un microorganism este foarte complex, comparativ cu răspunsul imun faţă de un antigen macromolecular, datorită complexităţii antigenice a celulelor. La rândul lor, cele mai simple virusuri exprimă câteva antigene distincte, iar paraziţii pluricelulari au un număr nedefinit de antigene diferite pe suprafaţa lor.

Celulele bacteriene ocupă o poziţie intermediară, nu numai în privinţa complexităţii structurale, ci şi a heterogenităţi antigenelor celulare. Fiecare tip molecular al suprafeţei unei celule bacteriene poate să conţină câţiva epitopi, repetitivi (de natură polizaharidică) sau distincţi din punct de vedere chimic.

Problema heterogenităţii antigenice a virusurilor şi bacteriilor patogene este importantă nu numai din punct de vedere teoretic, ci este esenţială pentru aspectul practic al *vaccinării*, deoarece există riscul stimulării funcţiilor imune care nu au efect protector, ci dimpotrivă, consecinţa este agravarea maladiei infecţioase sau chiar activarea mecanismelor patogenităţii autoimune.

Evaluarea antigenicităţii moleculelor de suprafaţă ale virusurilor şi bacteriilor este dificilă, deoarece, o moleculă în soluţie poate avea o altă configuraţie a epitopilor decât în cazul integrării ei într-o structură. Diferenţa derivă din raporturile spaţiale cu moleculele vecine, pe suprafaţa virusului sau celulei. Din această cauză, răspunsul imun al organismului, la stimularea cu fiecare agent patogen rămâne un domeniu de studiu practic nelimitat. O altă complicaţie derivă din faptul că specificitatea antigenică a unor molecule este uneori variabilă.

Răspunsul imun antibacterian şi antiviral este atât humoral cât şi celular. Prevalenţa unuia sau altuia din cele două compartimente este diferită în funcţie

de natura agentului infecţios. De cele mai multe ori predomină răspunsul imun mediat humoral. În cazuri mai rare (infecţia cu *M. leprae* sau *M. tuberculosis*) este preponderent răspunsul imun mediat celular.

Răspunsul imun faţă de diferite antigene ale agenţilor patogeni are diferite grade de protecţie antiinfecţioasă, în funcţie de natura agentului, de gradul său de patogenitate şi de natura răspunsului imun pe care-l iniţiază.

Uneori răspunsul imun antiinfecţios este puţin benefic pentru organismul gazdă sau este chiar detrimental, ca rezultat al unor mecanisme diferite de acţiune:

– răspunsul imun este orientat faţă de componentele moleculare neesenţiale ale agentului patogen şi declanşarea sa împiedică activarea unui răspuns imun eficace;

– răspunsul imun produce leziuni mai puternice şi mai extinse decât virusul sau microorganismul însăşi, adică determină reacţii de hipersensibilitate şi/sau autoimunitate.

Unele componente antigenice ale unui agent patogen determină un răspuns imun mai eficient. Ele poartă denumirea de *situsuri critice*. Organismele diferitelor specii pot să recunoască acelaşi antigen critic şi să producă anticorpi specifici cu eficienţă diferită, deoarece au specificitate faţă de *epitopi* diferiţi ai acelui antigen.

Structura antigenică a celulei bacteriene

Localizarea determinanţilor de specificitate antigenică pe suprafaţa celulei bacteriene este dificilă datorită diversităţii moleculelor potenţial capabile să activeze mecanismele imunitare. Pe de altă parte, eficienţa răspunsului imun antibacterian depinde de raportul dintre activitatea sistemelor imunitare efectoare şi mecanismele de autoprotecţie ale bacteriei, menite să devieze răspunsul imun.

Din punct de vedere antigenic, bacteriile interacţionează cu gazda, prin modalităţi diverse, de la producerea unor cantităţi mici de toxine, de către cele lipsite de atributul invazităţii, până la cele care cresc numeric cu o rată logaritmică în ţesuturi sau în sânge.

Unele bacterii prezintă pe suprafaţă, determinanţi antigenici asemănători ca structură chimică, cu moleculele proprii organismului. Răspunsul imun va fi absent sau nesemnificativ. Alteori, suprafaţa bacteriană conţine determinanţi antigenici de natură proteică sau polizaharidică, inductori ai unui răspuns imun prompt. Un răspuns imun antibacterian eficient trebuie să aibă ca rezultat final, lezarea structurii peretelui bacterian, urmată de liză, ca o consecinţă a activării sistemului complement.

Cele mai semnificative structuri bacteriene din punct de vedere antigenic sunt cele parietale. Bacteriile patogene prezintă 4 tipuri majore de structuri

parietale: peretele Gram pozitiv, peretele Gram negativ, peretele complex al micobacteriilor şi structurile parietale ale spirochetelor. Toate cele 4 categorii structurale de perete conţin o componentă peptido-glicanică (mureina), dar se deosebesc prin alte numeroase structuri moleculare, cu semnificaţie antigenică.

În cazul bacteriilor Gram negative, componentele antigenice esenţiale ale membranei externe a peretelui celular sunt *lipopolizaharidele* (LPS). Specificitatea lor antigenică este conferită de polizaharidul O, structură *imunodominantă*, care cuprinde până la 40 unităţi glucidice. Numeroasele variaţii structurale ale catenei glucidice determină existenţa unui număr corespunzător de variante antigenice bacteriene.

Structura moleculară antigenică esenţială a bacteriilor Gram pozitive este *peptidoglicanul*, care formează peste 50% din greutatea uscată a peretelui. Mureina are unele proprietăţi toxice şi pirogenice similare cu ale endotoxinei. Acizii teichoici sunt deasemenea molecule antigenice, stimulatoare ale răspunsului imun.

Proteinele de suprafaţă asociate peretelui celular au uneori semnificaţie antigenică. Cele mai cunoscute sunt proteinele M de la *Streptococcus* (grup A), care conferă specificitate de tip. Sunt peste 80 de variante antigenice ale proteinei M, dar fiind asemănătoare fibrei musculare cardiace nu stimulează răspunsul imun, ci au rol de factor de virulenţă.

Polizaharidele capsulare ale unor bacterii patogene Gram pozitive şi negative, libere în supernatant sau legate de perete sunt foarte imunogene dacă conţin lipide sau proteine terminale. Variaţia lor antigenică derivă nu numai din schimbarea ordinii unităţilor componente, ci în primul rând din posibilitatea legării monozaharidelor de oricare din cei 6 atomi ai hexozei adiacente. Diferenţele de secvenţă a subunităţilor monozaharidice generează determinanţi antigenici

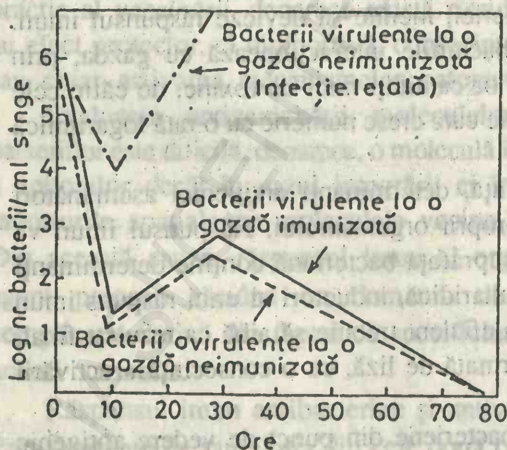


Fig. 67. Rolul anticorpilor în imunitatea antiinfecţioasă. Reprezentarea schematică a ritmului de dispariţie a bacteriilor din circulaţie, în organisme imunizate şi neimunizate. La gazdele imunizate, bacteriile virulente dispar la fel de repede ca şi bacteriile avirulente, în organismele neimunizate.

diferiţi, care nu reacţionează încrucişat cu anticorpii specifici faţă de un alt determinant cu aceiaşi compoziţie.

Materialul capsular este inhibitor al fagocitozei, deoarece celulele fagocitare nu au receptori pentru componentele oligozaharidice ale polizaharidelor capsulare. Uneori acestea sunt asemănătoare oligozaharidelor din moleculele glicoproteice proprii organismului, ceea ce explică slaba lor imunogenitate.

Toxinele de natură proteică sunt imunogene şi stimulează răspunsul imun cu efect protector.

Micobacteriile prezintă un perete celular foarte rezistent la acţiunea factorilor litici, cu o structură moleculară particulară. În alcătuirea sa intră *glicolipide*, formate din resturi de acid micolic legate covalent de resturile de carbohidrat ale arabino-galactanului. Complexul glicolipidic se leagă prin punţi fosfat, de peptidoglican.

Spirochetele prezintă o membrană externă bogată în lipide, stimulatoare a sintezei anticorpilor şi a reacţiilor de hipersensibilitate.

În concluzie, tabloul antigenic al celulei bacteriene este complex şi variabil, nu numai de la o specie la alta, ci chiar între tulpinile diferite ale aceleiaşi specii.

Pentru producerea efectului litic, esenţial în apărarea antibacteriană, moleculele de anticorpi şi proteinele complementului trebuie să se lege într-un situs celular care să permită lezarea peretelui celular. Uneori, anticorpii au efect opus, de protecţie a celulei bacteriene, deoarece activează complementul la situsuri neesenţiale ale bacteriei. De exemplu, anticorpii antiflagelari, care *in vitro* mediază reacţia de aglutinare de tip H au probabil o eficienţă mai scăzută *in vivo*, limitată la inhibarea mobilităţii.

Răspunsul imun în infecţiile cu bacterii toxigene, lipsite de invazivitate (*Corynebacterium, Clostridium tetani*, clostridiile enterice) este de tip humoral antitoxic.

Bacteriile invazive care determină infecţii regionale (sistemice) sau generalizate se disting în funcţie capacitatea lor de a se localiza intracelular sau extracelular.

Bacterii cu localizări extracelulare	*Bacterii facultativ intracelulare*
Streptococcus sp.	*Mycobacterium tubeculosis*
Staphylococcus sp.	*Mycobacteriun leprae*
Neisseria sp.	*Brucella sp.*
Escherichia coli	*Listeria monocytogenes*
Klebsiella sp.	*Yersinia sp.*
Proteus sp.	*Salmonella typhi*
Pseudomonas sp.	*Salmonella paratyphi*
Bacteroides fragilis	*Treponema pallidum*
Hemophilus influenze	
Actinomyces sp.	

(Modificat după Kasper şi Finberg, 1987)

Bacteriile cu localizare *extracelulară* induc un răspuns imun mediat humoral. Activarea limfocitelor B este realizată prin cooperarea cu celulele T_H. În focarul de inflamaţie, bacteriile extracelulare determină formarea abcesului, în care predomină polimorfonuclearele. Pentru formarea abcesului este necesară activarea celulelor T.

Bacteriile cu localizare *intracelulară* induc preponderent un răspuns imun mediat celular. Persistenţa lor în celulele fagocitare are ca rezultat final formarea *granulomului*. Cele mai tipice granuloame se formează în infecţii cu *M. tuberculosis* şi *M. leprae*. Nivelul activităţii limfocitelor T este esenţial pentru supravieţuirea celulelor de *Mycobacterium* în interiorul macrofagului.

Tipuri de imunitate dobândită (adaptativă)

Homeostazia organismului uman şi animal este asigurată de sisteme complexe de apărare, ale căror particularităţi funcţionale au fost definite în primul rând în raport cu modul de acţiune faţă de agenţii infecţioşi.

Organismele dispun de două mari compartimente de apărare:

– cele de apărare *specifică*, reprezentate de sistemul imunitar;

– cele de apărare *nespecifică*, care asigură rezistenţa sau *imunitatea naturală*.

Prin imunitate *naturală* înţelegem rezistenţa unui organism faţă de un agent infecţios sau faţă de un parazit, în absenţa unui răspuns imun evident.

Cele două sisteme de apărare, specifică şi nespecifică se condiţionează reciproc, dar nu se poate face o evaluare a gradului în care mecanismele de rezistenţă naturală sunt influenţate de contactul cu virusurile şi microorganismele. Pe de altă parte, răspunsul imun detectabil sau subliminal poate produce schimbări semnificative ale stării de activitate a *sistemului fagocitar mononuclear* şi a celulelor killer.

Mecanismele imunitare de apărare antiinfecţioasă au caracter *specific şi adaptativ*. Ele intră în acţiune numai după contactul cu stimulul antigenic (nonself). Răspunsul imun are un caracter net de specificitate faţă de antigenul declanşator. Mecanismele imunitare au o anumită finalitate a activităţii lor, aceea de a recunoaşte antigenul, de a-i neutraliza activitatea (anihilarea infecţiozităţii virusurilor, neutralizarea toxinelor), facilitând degradarea şi eliminarea sa din organism.

Activitatea sistemului imunitar se bazează pe activarea unor sisteme celulare complexe: sistemul *imunocitar* (reprezentat de limfocitele angajate în elaborarea răspunsului imun) *şi sisteme celulare cu acţiune nespecifică* (sistemul fagocitar mononuclear şi polimorfonuclear).

Imunitatea dobândită are un caracter specific şi se defineşte ca o stare de rezistenţă antiinfecţioasă, cu caracter individual, condiţionată de contactul anterior al organismului cu agentul infecţios virulent sau cu produsele lui toxice în stare nativă (într-un proces infecţios natural) sau cu agentul infecţios

atenuat şi anatoxinele sale (în cazul vaccinării). Imunitatea dobândită denumită şi *inductibilă* este de obicei relativă, în sensul că, deşi în general este foarte solidă poate fi învinsă prin agresiunea exercitată de o cantitate mare de virusuri sau bacterii sau de atacul unei tulpini deosebit de virulente.

În funcţie de originea şi modul de instalare, imunitatea dobândită este de două tipuri: dobândită în mod *natural* şi dobândită în mod *artificil*. În ambele cazuri imunitatea poate fi dobândită atât *activ*, prin răspuns imun propriu la stimulul antigenic, cât şi *pasiv*, prin transferul anticorpilor exogeni.

Imunitatea dobândită natural în mod activ este proprie organismelor după ce au trecut printr-o stare de infecţie aparentă (decelabilă clinic) sau inaparentă şi care au devenit astfel rezistente la reîmbolnăvire. Durata acestei stări de imunitate este variabilă. Trecerea prin unele infecţii asigură o protecţie specifică pentru tot restul vieţii (rujeola, variola, varicela, oreionul); alte infecţii (difteria, scarlatina, tusea convulsivă etc.) conferă o protecţie mai puţin solidă, astfel încât la o nouă expunere (după câţiva ani) organismele pot face din nou boala într-o formă mai uşoară decât prima îmbolnăvire. După infecţia gripală, starea de imunitate este scurtă (1–3 ani). Ca mecanism, această imunitate este condiţionată de faptul că organismul a dobândit o reactivitate deosebită, legată de memoria sa imunologică, datorită căreia, la un contact ulterior cu antigenul respectiv va reacţiona foarte activ, împiedicând evoluţia infecţiei.

Imunitatea dobândită natural în mod pasiv este rezultatul transmiterii transplacentare a anticorpilor de la mamă la făt şi al transferului lor prin colostru de la mamă la nou născut. Această formă de imunitate este variabilă calitativ şi cantitativ în funcţie de diversitatea antigenelor la care a fost expus organismul matern. Transferul gamaglobulinelor prin filtrul placentar depinde de structura placentei, respectiv de numărul de straturi tisulare interpuse între circulaţia maternă şi cea fetală. Astfel, tranzitul anticorpilor este limitat la animalele care au placentă cu structură epiteliocorială (cu 7 straturi de ţesut) cum sunt bovinele, cabalinele şi porcinele şi este foarte intens la cele cu placentă hemocorială (omul, maimuţa, rozătoarele). La om, nou-născutul primeşte anticorpi materni şi după naştere prin colostrul bogat în imunoglobuline, provenite din circulaţia maternă.

Imunitatea dobândită în mod natural şi pasiv asigură nou-născutului o stare de nereceptivitate faţă de maladiile infecţioase pentru care organismul matern este imun şi faţă de care el însuşi dispune de substanţele protectoare de origine maternă primite prin intermediul placentei. Imunitatea dobândită scade treptat după naştere, prin dispariţia anticorpilor materni din organismul copilului, în aşa fel încât, după o perioadă variabilă de timp (3–6 luni), acesta devine sensibil faţă de agenţii patogeni respectivi, deoarece, odată cu anticorpii specifici, el

nu a moştenit şi capacitatea caracteristică imunităţii active de a reface şi menţine anticorpii specifici la un nivel de concentraţie adecvată. Imunitatea transplacentară explică raritatea bolilor infecţioase la copil în primele 3 luni după naştere.

Imunitatea dobândită artificial reprezintă o stare de rezistenţă a organismului, realizată prin intervenţia voită a omului, respectiv prin injectarea unor produse biologice capabile să stimuleze formarea anticorpilor protectori (vaccinuri) sau conţinând substanţele protectoare gata formate (seruri imune). În primul caz, când organismul uman sau animal sintetizează substanţele protectoare prin propriile sale mijloace, imunitatea dobândită este *activă*; în cel de-al doilea, când le primeşte ca atare, imunitatea dobândită este *pasivă*.

Denumirea de *vaccin* vine de la cuvîntul latin „vaca" şi semnifică originea primului vaccin viral pe care E. Jenner (1798) l-a utilizat pentru controlul variolei cu virus vaccinal. Ultimul se distinge prin proprietăţile sale, atât faţă de virusul variolei (smallpox) cât şi faţă de cel al vaccinei.

Imunitatea dobândită artificial în mod activ este consecutivă administrării *vaccinurilor*. Acestea sunt produse biologice care conţin bacterii vii cu virulenţă atenuată, bacterii omorâte, toxine modificate (anatoxine), sau virusuri infecţioase dar cu virulenţă atenuată ori inactivate şi care, introduse în organismul uman sau animal stimulează formarea anticorpilor protectori specifici, generând o stare de imunitate temporară faţă de agentul din care au fost preparate.

Preparatul vaccinal trebuie să fie *eficient*, adică să inducă un răspuns imun protector, a cărui memorie să se păstreze în timp şi să prezinte un grad înalt de *siguranţă*, adică să nu determine efecte secundare defavorabile.

Administrarea unui vaccin se face pe baza unei strategii prealabile, bine definită. Scopul vaccinării poate fi *eradicarea, eliminarea* sau *limitarea* unui proces infecţios. Eradicarea semnifică dispariţia agentului patogen. *Eliminarea* se referă la dispariţia manifestărilor patologice, dar agentul patogen se păstrează în populaţia umană sau animală. *Limitarea* defineşte controlul unei maladii infecţioase până la un nivel la care nu mai reprezintă o problemă de sănătate publică.

În general, vaccinurile se administrează înainte de a se produce infecţia cu tulpina sălbatică a agentului patogen. Face excepţie virusul rabic (cu sediul replicării în sistemul nervos central), caz în care vaccinul se administrează după ce s-a produs infecţia. Acest fapt este posibil, deoarece perioada îndelungată de incubaţie a virusului de tip sălbatic permite elaborarea unui răspuns imun eficient, faţă de preparatul vaccinal care modifică evoluţia infecţiei.

Vaccinurile de origine bacteriană

Vaccinurile vii constau din suspensii de bacterii vii, dar cu virulenţă atenuată astfel încât să nu determine o infecţie aparentă, dar să rămână capabile să iniţieze o infecţie inaparentă, cu efect imunizant. Vaccinurile vii conţin un număr mic de celule viabile, slab virulente şi care, după administrare induc o imunitate solidă, comparabilă aceleia consecutive trecerii prin boală, fără să fi provocat însă decât cel mult semne minime de îmbolnăvire. Indiferent de locul inoculării, agentul infecţios din vaccinul viu nu rămâne localizat, ci se răspândeşte în organism, pătrunzând şi multiplicându-se în aceleaşi ţesuturi în care se localizează şi în cazul infecţiei naturale. Infectând un număr mic de celule sensibile şi multiplicându-se lent, agentul infecţios din vaccin nu declanşază o boală clinică, ci numai o infecţie de formă atenuată, care este însoţită de modificări umorale şi de reactivitate, necesare instalării stării de imunitate.

Pentru prepararea vaccinurilor vii se utilizează mutante bacteriene cu virulenţă atenuată, selecţionate prin cultivarea unor tulpini sălbatice la temperaturi nefavorabile (de exemplu, la o temperatură superioară celei optime în cazul vaccinului contra cărbunelui), sau prin acţiunea unor substanţe chimice şi a unor medii de cultură nefavorabile (vaccinul BCG contra tuberculozei).

Vaccinurile omorâte constau din suspensii bacteriene omorâte prin încălzire la temperaturi ridicate (60°) ori sub acţiunea formolului sau a fenolului şi care conţin totdeauna una din aceste substanţe ca prezervant. Din această categorie fac parte vaccinul tifoparatific (TAB), pertusis (contra tusei convulsive), stafilococic.

Anatoxinele (toxoizii) sunt produse cu proprietăţi imunogene, derivate din exotoxine. Uneori, toxinele se transformă spontan în derivaţi atoxici, dar păstrează proprietăţile de imunogenicitate şi specificitate ale toxinei native. Mecanismul inactivării nu este cunoscut. Este un proces lent şi progresiv, dependent de pH, temperatură, prezenţa ionilor sau a proteinelor contaminante, de procesul îmbătrânirii preparatului. Un factor major al inactivării pare a fi proteoliza parţială a moleculelor de toxină sub acţiunea proteazelor contaminante, dar şi schimbarea conformaţiei moleculei, polimerizarea sau detaşarea unui fragment molecular pot acţiona în acelaşi sens.

Inactivarea toxinelor şi transformarea lor în produse atoxice are loc în condiţii dirijate în prezenţa formolului 4‰, la 37° şi rezultă *anatoxine*. Fenomenul a fost descoperit de Ramon (1925). Beta-propiolactena, 2-4-dinitrofluorbenzenul şi glutaraldehida au aceleaşi efecte asupra toxinelor.

Pentru a fi utilizată ca vaccin, o anatoxină trebuie să îndeplinească următoarele condiţii: a) să fie imunogenă şi să inducă formarea unei cantităţi suficiente de

anticorpi pentru a neutraliza, *in vivo,* toxina nativă; b) să fie complet lipsită de toxicitate; c) să aibă proprietăţi alergizante cât mai diminuate.

Anatoxina ideală ar putea fi produsă de microorganisme manipulate genetic sau prin mutaţii ale genei codificatoare a toxinei. Ea ar fi o proteină netoxică, dar cu aceleaşi proprietăţi de imunogenicitate cu ale toxinei native, capabilă să inducă sinteza anticorpilor neutralizanţi.

Condiţiile optime pentru obţinerea anatoxinelor sunt proprii fiecărei toxine şi au fost optimizate empiric, deoarece mecanismele moleculare ale inactivării nu se cunosc. În general, condiţiile optime pentru obţinerea anatoxinelor sunt următoarele:

– concentraţia proteică trebuie să fie de 1 mg/ml, iar cea de formol, de 1,3 mg/ml;

– temperatura de detoxifiere este de 37–40°;

– pH optim este 7,8–8,2 pentru toxinele difterică şi tetanică şi 5,5 pentru cea botulinică;

– durata contactului cu formolul este de 3–5 săptămâni.

Detoxifierea începe simultan cu adăugarea formolului. Ea este evidentă după un minut şi creşte exponenţial timp de 24 ore, când toxicitatea are valoare foarte scăzută şi tinde spre 0 la 5 zile. Forma netoxică poate reveni total sau parţial la forma toxică. De aceea este necesară prelungirea contactului cu formolul o perioadă mai lungă de timp. Molecula de anatoxină are o structură stabilizată, prin formarea legăturilor noi între formol şi resturile aminoacil, dar în acelaşi timp, prin acţiune prelungită, formolul are rolul unui agent de reticulare pentru că favorizează formarea legăturilor între moleculele proteice identice, ceea ce explică polimerizarea unor anatoxine.

Exotoxinele bacteriene, ca şi anatoxinele sunt imunogene foarte bune pentru om, cal, iepure, cobai, în special după asocierea cu adjuvanţi (fosfat de calciu). Prin hiperimunizarea calului se obţin seruri hiperimune antidifterice şi antitetanice, utilizabile în seroterapie. Datorită riscului reacţiilor imune secundare (alergie, şoc anafilactic) OMS recomandă înlocuirea serurilor hiperimune obţinute pe animale, cu cele umane, obţinute de la donori hiperimunizaţi.

După conţinutul lor, vaccinurile pot fi *monovalente*, cele care conţin antigenele unei singure tulpini bacteriene sau virale (de exemplu, vaccinul stafilococic), *bi-*, *tri-*, sau *polivalente,* cele care conţin antigene provenind de la 2–3 sau mai multe specii de microorganisme (de exemplu, vaccinul diftero–tetano–pertusis).

După provenienţa bacteriilor folosite la prepararea vaccinului se poate vorbi de *autovaccin,* adică vaccinul este preparat cu o tulpină de microorganisme izolată de la un bolnav şi este destinat a fi folosit numai de bolnavul respectiv

şi de *stock–vaccinuri*, produse în general din mai multe tulpini şi destinate a fi folosite pentru imunizări în masă.

Vaccinurile virale

Majoritatea vaccinurilor virale sunt eficiente în ceea ce priveşte *prevenirea îmbolnăvirii*, dar sunt mai puţin eficiente cu privire la *prevenirea infecţiei*. Prevenirea procesului infecţios este o necesitate absolută în unele cazuri, ca de exemplu virusul hepatitei B şi HIV.

Scopul major al vaccinării cu virusul hepatitei B este de a împiedica transmiterea infecţiei pe verticală, de la organismul matern infectat persistent, la copil, în perioada neonatală. Infecţia neonatală măreşte riscul carcinomului hepatic. Imunizarea neonatală cu antigenul de suprafaţă al virusului hepatitei B are o eficienţă de 90%.

Prevenirea infecţiei este dificilă pentru orice imunizare antivirală, dar în cazul HIV pare şi mai dificilă, deoarece nu se sintetizează anticorpi neutralizanţi faţă de virusul infectant.

Vaccinurile virale sunt de trei categorii: vaccinuri cu virus *activ*, vaccinuri cu virus *inactivat* şi vaccinuri *subunitare*.

Vaccinurile cu virus activ atenuat (infecţios) îşi au originea în tulpinile virale umane (cu excepţia virusului vaccinal), dar sunt complet sau aproape complet lipsite de patogenitate şi sunt capabile să inducă un răspuns imun protector. Ele se multiplică în organismul uman şi realizează o stimulare antigenică continuă într-un interval de timp. Aceste vaccinuri conferă o imunitate de durată, după o singură doză.

Cele mai ample programe de imunizare cu vaccinuri atenuate sunt vaccinarea antivariolică, antipoliomielitică şi antirujeolică.

Atenuarea virusurilor s-a realizat pe mai multe căi:

– folosirea unui virus înrudit de la o altă gazdă. Cel mai vechi vaccin viral (Jenner, 1798) utilizat în controlul variolei este virusul vaccinal, care pe baza studiilor moderne denotă o mai mare asemănare cu virusul variolei (smallpox) decât cu cowpox;

– inocularea agentului patogen sau parţial atenuat pe o cale nenaturală. Această metodă este folosită pentru obţinerea vaccinurilor de uz veterinar. Pentru om nu este folosită, deoarece riscul infecţiei este mare;

– pasajul virusului de origine umană într-un substrat „nenatural". Cele mai importante vaccinuri la om şi animale au fost obţinute pe această cale. Virusul se cultivă în mod repetat prin inoculare la organisme sănătoase sau în culturi primare de celule: virusul febrei galbene s-a inoculat la şoarece şi apoi în embrioni

de găină; poliovirusul s-a inoculat în celulele de rinichi de maimuță; virusul rujeolei – în cultură de fibroblaste de embrion de găină.

Mutantele selectate prin pasaje într-un substrat celular nenatural sunt rezultatul unui cumul de evenimente mutaționale întâmplătoare. Dintre acestea se utilizează în practica vaccinării, acelea care au proprietățile dorite de atenuare și imunogenitate.

Unul din marile succese ale acestei metode de atenuare este prepararea vaccinului polio: s-a selectat o linie caracterizată prin lipsa virulenței la maimuță, după inoculare în creier sau în măduva spinării.

Vaccinurile virale atenuate au avantajul important al stimulării ambelor compartimente ale răspunsului imun: celular și humoral, sistemic și local. Acest fapt este deosebit de important pentru infecțiile virale în care imunitatea mediată celular are un rol esențial, cât și pentru infecțiile virale, ale mucoaselor, situații în care, atât imunitatea locală cât și cea sistemică sunt necesare pentru rezistența optimă.

Vaccinurile virale atenuate stimulează răspunsul imun față de fiecare din antigenele protectoare ale unui virus. Imunitatea indusă de aceste vaccinuri este mai durabilă, mai eficientă și are un spectru mai larg de reactivitate încrucișată, decât aceea indusă de virusurile inactivate. Reactivitatea încrucișată este foarte importantă pentru virusurile care suferă variație antigenică progresivă.

Vaccinurile virale atenuate păstrează capacitatea de replicare în organismul vaccinat, astfel încât virusul se răspândește în populație și imunizează chiar indivizii nevaccinați.

Vaccinurile atenuate se produc cu un preț de cost mai scăzut și se administrează mai ușor.

Dezavantajele vaccinurilor virale atenuate sunt legate de riscul ridicat al *contaminării* cu agenți supraadăugați. Loturile inițiale de vaccin polio au fost contaminate cu SV_{40}, din celulele de rinichi de maimuță, dar nu s-a constatat creșterea incidenței tumorilor la copiii vaccinați. Virusul contaminant a fost eliminat repede din vaccin.

Unele virusuri atenuate (rujeolic, rubeolă, febră galbenă) păstrează un nivel scăzut de virulență reziduală. O problemă importantă legată de infecțiozitatea vaccinurilor atenuate este aceea a restaurării unui grad variabil de virulență după vaccinare. Cu o frecvență mică ($1/10^6$–10^7), după vaccinarea cu poliovirus, procesul infecțios evoluează cu manifestări clinice (paralizie), la copiii cu deficiențe ale sistemului imunitar. Procesul infecțios nu este consecința alterării genetice a virusului din vaccin.

Vaccinurile atenuate ridică problema instabilităţii genetice. Virusul rujeolic atenuat este labil, în special la variaţiile termice şi de aceea necesită un regim termic constant (+4°), pe toată durata depozitării.

Vaccinurile *inactivate* conţin virioni care nu pot să se replice. În acest scop, virusurile se cultivă în oul embrionat de găină (influenza), în culturi celulare de rinichi de maimuţă (polio) sau în fibroblaste diploide umane (polio, rabic). Rezultă un preparat viral brut, care se inactivează cu formol sau acetiletilenimină sau β – propiolactonă.

Vaccinurile virale inactivate au avantajul riscului minim al infecţiei. Rareori, astfel de vaccinuri conţin virus infecţios, care a rezistat inactivării, sau care provine din contaminarea cu un alt virus.

Vaccinurile virale inactivate prezintă câteva dezavantaje. Tratamentul extensiv cu agent de inactivare poate să anuleze imunogenitatea, iar tratamentul insuficient determină păstrarea infecţiozităţii suficiente pentru a produce îmbolnăvirea. Unele vaccinuri inactivate au potenţat infecţia, în loc s-o prevină. Un vaccin rujeolic inactivat cu formol a prevenit iniţial infecţia, dar după câţiva ani indivizii vaccinaţi au pierdut starea de rezistenţă. Inactivarea cu formol a anulat imunogenitatea proteinei de fuziune (F), astfel încât vaccinul şi-a pierdut proprietatea de protecţie.

Vaccinurile inactivate sunt dezavantajoase în privinţa stimulării limfocitelor Tc, care au rol important în recuperarea şi în rezistenţa la infecţiile cu o gamă de virusuri. Acest tip de răspuns este indus de proteinele virale prelucrate şi prezentate în asociaţie cu moleculele CMH I, celulelor imunitare.

Alte căi de obţinere a unor noi vaccinuri virale

Calea de abordare a lui Jenner (1798) pentru obţinerea preparatelor virale utilizabile ca vaccin implică izolarea unor virusuri de la mamifere sau păsări, pentru a imuniza omul faţă de un virus uman, înrudit antigenic cu cel animal. Virusurile mamaliene şi aviare, bine adaptate la gazdele lor, adesea nu se replică eficient în celulele umane şi deci se atenuează. Nu se cunoaşte determinismul genetic al restricţiei spectrului de gazdă. Genele virusurilor mamaliene sau aviare, identificate ca fiind responsabile pentru restricţia spectrului de gazdă au o mare diversitate de secvenţe de nucleotide, faţă de genele corespunzătoare ale virusurilor umane. Efortul de a realiza noi vaccinuri pe calea clasică jenneriană trebuie să aibă în vedere tehnicile de genetică virală, biologie moleculară şi imunologie.

Utilizarea virusurilor umane atenuate ca vaccinuri. Uneori, virulenţa diferitelor linii de virus uman ce aparţin aceluiaşi serotip variază considerabil. Sabin (1957) a observat că liniile de poliovirus izolate de la persoanele sănătoase au manifestat

o largă variaţie a neurovirulenţei, măsurabilă prin inocularea intracerebrală sau intraspinală a maimuţei. Circa 1/5 din aceste linii au fost foarte atenuate. Aşa s-a identificat linia de poliovirus tip 2, utilizabilă ca vaccin oral.

Vaccinurile subunitare. Iniţial vaccinurile inactivate s-au obţinut din preparatele brute de virus după replicarea sa în culturi celulare sau în ţesuturi. Pe măsură ce a fost posibilă obţinerea unor titruri înalte de virus, în scopul diminuării toxicităţii vaccinului s-a trecut la purificarea virusului şi a unor componente virale. Pentru virusul influenza, vaccinul subunitar conţine antigenele de suprafaţă, hemaglutinina şi neuraminidaza. Preparatul este mai puţin toxic decât virusul integral inactivat, dar este mai puţin eficient în stimularea răspunsului imun. Producerea vaccinurilor subunitare proteice, în culturile de celule animale ridică probleme dificile de purificare a proteinelor virale, de proteinele celulare. Trebuie îndepărtat ADN celular, deoarece liniile în cultură continuă sunt maligne şi în consecinţă conţin ADN potenţial oncogen.

Celulele se infectează cu virus şi din lizatul celular se purifică proteinele virale. Lizatele celulare, mai mult chiar decât virusul purificat se folosesc cu predilecţie, deoarece în celulele infectate se sintetizează proteine virale în mare exces, care nu sunt încorporate în virioni.

Tehnici moderne de obţinere a vaccinurilor. Dezvoltarea biologiei moleculare şi progresul înţelegerii mecanismului răspunsului imun au influenţat preocupările privind obţinerea unor noi vaccinuri. Cu ajutorul anticorpilor monoclonali este posibilă identificarea epitopilor cu rol esenţial în stimularea răspunsului imun. Genele codificatoare pentru antigenele protectoare se pot izola după fragmentarea genomului cu ajutorul enzimelor de restricţie şi se inseră, prin tehnologia ADN recombinant, în celula procariotă (*E. coli, B. subtilis*), sau în celulele eucariote (levuri, celule mamaliene).

Fragmentarea genomului cu endonucleaze de restricţie este posibilă numai pentru virusurile ADN. Genomul virusurilor ARN trebuie transcris mai întâi în ADN şi ulterior este manipulat. Sunt adecvate unor asemenea tehnici, virusurile ARN cu catenă de sens pozitiv (poliovirusul). ADNc al unei catene ARN de sens negativ nu a fost transferat în celulă.

Celulele mamaliene reprezintă un sistem optim pentru producerea proteinelor virale, deoarece plierea, transportul celular şi prelucrarea sunt asemănătoare celor ce au loc în celula gazdă. Ele produc cantităţi mari de antigen viral.

ADN viral este funcţional după transferul în celula procariotă, prin intermediul unui vector (plasmidă sau fag).

O altă modalitate de a produce vaccinuri virale atenuate, stabile genetic implică obţinerea *mutantelor de deleţie.* Aceste mutante au o capacitate redusă

de replicare, ceea ce echivalează cu atenuarea. Se fac eforturi pentru a obţine mutante virale stabile, prin deleţie, al căror efect să fie atenuarea accentuată a virusului, însă cu păstrarea infecţiozităţii şi imunogenităţii.

O variantă a tehnicilor de ADN recombinant este obţinerea vaccinurilor cu *virusul vaccinal hibrid.* ADN viral este introdus în genomul virusului vaccinal prin recombinare la situsuri omologe. Virusul vaccinal hibrid se multiplică în celule şi produce antigenele unui spectru larg de virusuri. În genomul virusului vaccinal au fost inserate gene ale virusurilor hepatitei B, rabic, herpes simplex etc. Vaccinurile virale hibride sunt stabile şi stimulează ambele compartimente ale răspunsului imun.

O altă modalitate de a produce vaccinuri virale este *sinteza in vitro* a peptidelor. Metodele de secvenţiere a bazelor au făcut posibilă determinarea secvenţei aminoacizilor unor proteine cu activitate biologică. Antigenele peptidice sintetice sunt avantajoase, deoarece au o structură chimică bine definită şi sunt lipsite de componentele inutile pentru stimularea răspunsului imun. Dezavantajul este că aceste antigene stimulează într-o măsură prea mică limfocitele T.

Caracterele generale ale imunizării artificiale active.

Vaccinurile bacteriene omorîte, cele care conţin virioni inactivaţi şi anatoxinele se administrează, în general, pe cale parenterală (subcutanat, intradermic, intramuscular etc), în mod obişnuit în 3 injecţii separate, la intervale de 5–7–21 de zile. Vaccinurile vii se administrează într-o singură injecţie. Vaccinul BCG (viu) şi vaccinul antipoliomielitic cu virus infecţios atenuat, la nou născuţi se administrează pe cale orală.

Imunitatea consecutivă vaccinării se instalează relativ lent, la aproximativ 15–20 de zile de la ultima injecţie şi durează un timp variabil de la un vaccin la altul (în general, între 1 şi 7 ani), scăzând treptat până la dispariţia completă. Vaccinarea primară, ca şi infecţia, conferă organismului o stare specială de reactivitate – *memoria imunologică* – graţie căreia orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturală (infecţie şi boală) sau artificială (prin vaccinare), declanşează o „redeşteptare" rapidă a imunităţii, care de obicei se manifestă cu o intensitate mai mare decât aceea a răspunsului imun postvaccinal. Injecţia de rapel declanşează o reacţie anamnestică cu o creştere bruscă şi masivă a titrului anticorpilor.

Deşi este destul de solidă, imunitatea postvaccinală este relativă, în sensul că unele persoane vaccinate pot totuşi să facă boala (într-o formă mai uşoară), mai ales dacă se infectează masiv cu un agent patogen deosebit de virulent. Datorită faptului

că se instalează lent, imunizarea prin vaccinare este folosită în scop profilactic pentru a se evita riscul eventual de infecţie cu un agent patogen.

Imunitatea artificială pasivă. Serurile imune sau terapeutice sunt produse biologice obţinute din serul sanguin al unui animal imunizat activ prin vaccinare sau al unui convalescent imunizat activ prin boală. În ambele cazuri, serul conţine anticorpi protectori specifici, capabili să neutralizeze acţiunea agentului respectiv. Primele încercări de folosire a serurilor în terapeutică datează din 1888, când *Richet* şi *Hericourt* demonstrează că inocularea unor culturi bacteriene la un animal determină apariţia în serul lui sanguin, a unor substanţe care pot proteja nu numai organismul care le-a produs, ci şi organismele la care acest ser este injectat.

În general, serurile imune se prepară pe animale mari (de obicei pe cal) care sunt injectate după principiile imunizării active, cu doze repetate crescânde de celule, antigene virale, anatoxine sau toxine. Serul sanguin obţinut prin sângerarea animalelor imunizate este inactivat şi tratat cu fenol (prezervant), apoi controlat pentru sterilitate, inocuitate (lipsa de nocivitate) şi eficacitate (concentraţia de anticorpi). Serul se administrează sub formă de injecţii intravenoase, intramusculare sau subcutane. După cum specia organismului donator este sau nu aceiaşi cu a organismului receptor, serurile pot fi *omologe* (serurile recoltate de la convalescenţi), sau *heterologe* (serurile preparate pe cal). După natura antigenelor folosite pentru imunizarea animalului donator de anticorpi, serurile sunt de 3 categorii: 1) *antibacteriene*, preparate prin administrarea de corpi celulari (de exemplu, serurile antistreptococice şi antimeningocice); 2) *antitoxice*, obţinute prin injectarea de toxină şi anatoxină (de exemplu, serurile antidifteric şi antitetanic); 3) *mixte* (antibacteriene şi antitoxice) obţinute prin imunizarea cu corpi celulari şi cu toxine (de exemplu, serul antigangrenos).

Caracterele generale ale imunizării artificiale pasive. Imunitatea pasivă, consecutivă administrării serurilor imune se instalează imediat după injectarea intravenoasă sau după câteva ore, pe măsura resorbţiei anticorpilor, în cazul administrării pe alte căi. Imunitatea pasivă asigură o protecţie de scurtă durată (circa 30 de zile) datorită faptului că anticorpii primiţi în mod pasiv au *un timp de înjumătăţire* de 14 zile. Persistenţa lor este mai îndelungată dacă serul provine de la un organism de aceiaşi specie cu organismul receptor, deoarece imunoglobulina omologă este acceptată şi reţinută mai bine de acesta, decât cea heterologă.

În momemtul în care anticorpii exogeni sunt eliminaţi, organismul redevine receptiv faţă de infecţie. Datorită acestei particularităţi, serurile imune sunt folosite în special pentru tratamentul unei boli în evoluţie (*seroterapie*). Serurile imune antitoxice, ca şi serurile antivirale, acţionează în mod obişnuit acoperind cu anticorpi suprafaţa moleculelor de toxină şi a particulelor virale, ceea ce alterează configuraţiile chimice specifice care asigură adsorbţia moleculelor de toxină sau a

virionilor pe celulele sensibile. Datorită acestui mecanism de acţiune, eficienţa lor este maximă în cazul unei administrări cât mai precoce. Celulele lezate de toxine, ca şi acelea în care virusul a pătruns deja, nu mai pot fi apărate de anticorpii din serul imun.

Serurile antibacteriene acţionează făcând celulele mai sensibile la acţiunea fagocitelor şi a complementului. Serurile imune pot fi folosite şi în scop preventiv (*seroprofilaxie*) la persoane care au fost sigur în pericol de a se infecta şi la care urmărim să preîntâmpinăm declanşarea bolii. Pentru a evita riscurile de infecţie care pot surveni după epuizarea imunităţii pasive, se recomandă ca seroterapiei şi seroprofilaxiei să li se asocieze vaccinarea, aceasta lăsând o imunitate activă de lungă durată, care se instalează după eliminarea anticorpilor introduşi artificial în organism. În prezent se folosesc seruri imune concentrate şi purificate, din care s-au eliminat circa 3/4 din proteinele serului sanguin, păstrându-se numai fracţiunea globulinică specifică (anticorpi). Prin acest procedeu s-a redus foarte mult volumul serului injectat şi se evită accidentele care ar putea rezulta din sensibilizarea organismului uman faţă de proteinele nespecifice din serul de cal.

REZISTENŢA ANTIINFECŢIOASĂ NESPECIFICĂ

Factorii umorali şi celulari ai apărării specifice şi nespecifice fac parte din patrimoniul ereditar al organismului. Atât imunitatea dobândită cât şi cea naturală sunt înscrise în genotipul organismului respectiv, astfel încât capacitatea de reacţie imună (specifică) şi nespecifică sunt determinate genetic.

Rezistenţa sau imunitatea naturală, înăscută sau congenitală reprezintă capacitatea unui organism normal de a fi indemn faţă de un anumit agent patogen cu care vine în contact, sau de a-l îndepărta dacă acesta s-a implantat în ţesuturi. Această proprietate este o însuşire naturală (înăscută) a unei specii animale şi în mod obişnuit este *absolută*, adică toţi indivizii speciei respective sunt rezistenţi faţă de un anumit agent patogen, chiar în cazul inoculării lor cu doze mari ale agentului infecţios. De exemplu, omul este rezistent la agenţii care produc *zoonoze* (agentul pestei bovine, al pestei porcine, al holerei găinilor etc), iar animalele sunt rezistente la gonoree, rujeolă, oreion, dizenterie etc.

Starea de rezistenţă nu este condiţionată de contactul anterior cu agentul patogen respectiv, ci este o modalitate promptă de reacţie a organismului. Starea diametral opusă este aceea de *receptivitate* sau de *sensibilitate* (susceptibilitate), caracteristică organismelor care, ca rezultat al agresiunii unui agent patogen reacţionează prin apariţia unui proces infecţios. Starea de nereceptivitate este uneori *relativă*, în sensul că există deosebiri individuale de reactivitate în cadrul speciei,

unii indivizi fiind total rezistenţi, iar alţii prezintă diferite grade de receptivitate. Răspunsul diferit al organismelor unei specii, la contactul cu un agent patogen este rezultatul eficienţei variabile a forţelor de apărare ale organismului, care, izolate sau în asociaţie opun agentului patogen o barieră de nepătruns, determină inhibarea multiplicării sau distrugerea lui în ţesuturi sau umori, precum şi neutralizarea şi eliminarea substanţelor toxice eliberate de microorganisme. Diferenţele sunt probabil rezultatul unor factori de ordin genetic. De exemplu, oile din Alger sunt mult mai rezistente la infecţia cărbunoasă (produsă de *B. anthracis*) decât cele din Europa. La primele, macrofagele conţin un număr mai mare de lizosomi şi enzimele componente au activitate hidrolitică mult mai intensă. S-au evidenţiat diferenţe de sensibilitate a raselor umane faţă de tuberculoză; populaţiile africane sunt mai sensibile. Influenţele de ordin genetic asupra rezistenţei naturale au condus la concluzii de ordin practic. Pe acest criteriu se face selecţia populaţiilor (liniilor) genetic pure ale animalelor de laborator, care au o rezistenţă foarte mare faţă de un anumit agent patogen sau o sensibilitate deosebită.

Ori de câte ori un agent patogen vine în contact cu un organism neimunizat, iniţierea procesului infecţios este stopată, în primul rând, de intrarea în acţiune a mecanismelor rezistenţei constitutive, nespecifice, reprezentate de *barierele mecanice* (pielea şi mucoasele), de componentele *moleculare* antiinfecţioase, de componentele *celulare* care au capacitatea de fagocitoză, de reacţia inflamatorie. Ulterior, după activarea specifică intră în acţiune sistemul imunitar. Diferitele mecanisme de apărare sunt strâns integrate funcţional, astfel încât în orice punct al organismului, acţiunea lor este combinată. De exemplu, epiteliul tubului digestiv secretă lizozim, iar în pătura de mucus care îl tapetează se găseşte IgA secretor.

Factorii mecanici ai apărării organismului

Rolul pielii şi al mucoaselor. Tegumentul şi mucoasele reprezintă bariere mecanice foarte eficiente, deşi contactul lor cu microorganismele saprobionte sau patogene este aproape permanent. Particularităţile lor funcţionale sunt conferite de integritatea lor anatomică, de secreţii, de reînnoirea prin descumare, de impermeabilitatea sau permeabilitatea selectivă. Astfel, pielea este impermeabilă pentru virusuri şi microorganisme. Alterarea structurală, în special după arsuri este urmată de infecţii.

Suprafaţa tegumentului este acoperită cu o peliculă fină, formată din produsele de secreţie ale glandelor sudoripare şi sebacee, cu pH acid (pH 3,0–5,0) care are efect bacteriostatic. După spălarea peliculei de secreţie acidă, funcţia protectoare antiinfecţioasă diminuă.

Mucoasele sunt acoperite de secreţii. Conjunctiva este protejată prin acţiunea mecanică şi chimică a secreţiei lacrimale, în care se găseşte *lizozim*. Lizozimul are

efect enzimatic asupra peretelui mureinic bacterian. La nivelul tractului respirator, rolul protector este îndeplinit de secreţia care imobilizează agenţii invadatori, iar expulzarea lor este asigurată prin mişcarea cililor celulelor epiteliale şi prin reflexele de strănut şi tuse.

Mucoasa gastrică este protejată de gelul mucos care o tapetează, ce formează un adevărat glicocalix şi de aciditatea conferită de HCl, component al sucului gastric. Bacteriile Gram negative sunt foarte sensibile la acţiunea mediului acid gastric. După neutralizarea acidităţii gastrice cu substanţe alcaline, capacitatea sa protectoare diminuă până la dispariţie şi infecţiile se instalează rapid. Totuşi, pe cale digestivă pătrund agenţii patogeni a numeroase maladii, evitând bariera acidităţii gastrice. Bolul alimentar este protector faţă de aciditate şi în interiorul său există condiţii favorabile supravieţuirii agenţilor patogeni ingeraţi odată cu alimentele.

Secreţiile mucoase, în compoziţia cărora intră mucinele (glicoproteine) au rol important în apărarea antiinfecţioasă. Mucinele aderă la suprafaţa agenţilor patogeni şi a paraziţilor formând un strat molecular care împiedică interacţiunea lor cu celulele epiteliale. Lor li se atribuie deasemenea, un rol neutralizant asupra toxinelor. În acelaşi timp, secreţiile formează o peliculă fină (film) protectoare, continuă pe suprafaţa mucoasei, constituind o barieră greu de trecut pentru microorganisme, în drumul lor spre situsurile epiteliale de aderenţă. Pelicula elimină microorganismele care nu se pot adapta condiţiilor de sub peliculă, la graniţa mucus-epiteliu.

Un alt mecanism nespecific care controlează creşterea microorganismelor la zona de contact cu munoasa digestivă este *peristaltismul* intestinal. Microorganismele aderă la mucoasa epitelială prin intermediul unor molecule din categoria *lectinelor*, care realizează adevărate punţi de legătură între suprafaţa bacteriei şi a celulei epiteliale. Peristaltismul împiedică realizarea acestor interacţiuni, creind un flux care deplasează microorganimele patogene înainte ca ele să colonizeze suprafaţa epiteliului. Numeroase infecţii intestinale accelerează peristaltismul. Anomaliile peristaltismului sunt factori favorizanţi ai creşterii excesive a populaţiilor bacteriene ale microbiotei normale a tractului intestinal. În absenţa unui clearance mecanic normal al tractului digestiv, microbiota normală poate dobândi un rol patologic.

Rolul factorilor humorali în apărarea nespecifică

Hormonii au un rol esenţial în reglarea unor mecanisme homeostatice. Ei nu modifică specificitatea de reacţie a celulelor limfoide. Cantităţile optime de hormoni vor determina o funcţionalitate optimă a sistemului imunitar iar modificările lor cantitative vor induce perturbări corespunzătoare ale metabolismului limfocitelor. Cunoaşterea multiplelor interacţiuni dintre funcţia imunitară şi sistemul endocrin, precum şi perfecţionarea tehnicii de radioimunodozare (RIA) a

hormonilor au condus la delimitarea unei noi discipline intermediare – *imunoendocrinologia*.

Asemănarea dintre hormoni şi imunoglobuline rezultă din similitudinea structurală şi funcţională a celor două categorii de molecule: ambele conţin o regiune de legare la un receptor celular şi o alta capabilă să transmită semnale specifice la un sistem efector.

Există dovezi că moleculele CMH I, implicate în prezentarea antigenelor au rol de receptor pentru insulină.

Antigenicitatea hormonilor este într-o relaţie directă cu gradul deosebirilor chimice existente între hormonul exogen şi hormonul produs de organismul receptor. Consecinţa este sinteza anticorpilor antihormon.

Uneori, însă se sintetizează anticorpi anti-receptor hormonal. Cum se stimulează sinteza lor? Se consideră că receptorii de hormoni sunt „secretaţi" de celule în mediul intern. Moleculele sunt preluate şi prelucrate de celulele specializate şi sunt prezentate limfocitelor. Anticorpii antireceptor hormonal pot să blocheze funcţia hormonului respectiv.

Afecţiunile de natură endocrină au un răsunet major în raport cu rezistenţa nespecifică faţă de agenţii patogeni. Un exemplu în acest sens este patologia infecţioasă asociată cu diabetul. Bolnavii de diabet fac în mod frecvent infecţii de tip tuberculos, infecţii urinare şi tegumentare de tipul furunculozelor. Ele se datorează fie unor dezechilibre locale provocate de lipsa insulinei, fie glicemiei crescute.

Hormonii tiroidieni influenţează rezistenţa faţă de infecţii. Hipotiroidismul măreşte incidenţa infecţiilor. Cortisolul are influenţă directă asupra limfocitelor. Hipofuncţia suprarenaliană măreşte rezistenţa faţă de agenţii infecţioşi.

Capacitatea autosterilizantă a umorilor este un factor decisiv al rezistenţei nespecifice. În ţesuturi şi în umori se găsesc substanţe cu rol antibacterian. Astfel se explică rezistenţa organismului faţă de numeroasele agresiuni ale microorganismelor care pătrund permanent pe diferite căi în ţesuturi. Microorganismele (bacterii şi alţi agenţi infecţioşi) trec din lumenul intestinal în sânge, la toate animalele, inclusiv la om, datorită condiţiilor speciale de permeabilitate a epiteliului, create în timpul absorbţiei intestinale. Permeabilitatea mucoasei este mai accentuată la rumegătoare. La om s-a evidenţiat că postprandial se produce o bacteriemie temporară, originară în cavitatea bucală, ca rezultat al masticaţiei sau consecutivă periajului dentar. După extracţia dentară există chiar o perioadă septicemică (cu multiplicare bacteriană). Datorită stării de bacteriemie temporară, animalele ce urmează a fi sacrificate nu se hrănesc o perioadă de 10–20 ore înainte.

În mod obişnuit, stările de bacteriemie fiziologică nu sunt urmate de infecţii clinice, datorită capacităţii autosterilizante (clearance) a ţesuturilor şi umorilor, care se manifestă prin mecanisme variate:

– condiţiile tisulare sunt improprii multiplicării microorganismelor datorită în primul rând concentraţiei O_2: microorganismele strict anaerobe nu se multiplică în ţesuturile bine oxigenate, ci numai în cele traumatizate sau devitalizate. *C. perfringens*, agentul gangrenei gazoase creşte în rănile musculare provocate de explozii. *M. tuberculosis* este strict aerob, ceea ce explică localizarea sa preferenţială la nivelul ţesutului pulmonar. Prin multiplicare, celulele bacteriene determină necroza ţesutului pulmonar şi transformarea lui în zonă cazeoasă, în care O_2 nu difuzează. Se creează condiţii de anaerobie improprii multiplicării celulelor de *M. tuberculosis* şi astfel evoluţia infecţiei este limitată;

– substanţe din categoria lizinelor cu efect antibacterian: alfa- şi beta-lizine, spermina şi spermidina;

– properdina (*pro* şi *perdere*) descoperită de Pillemer (1954) este o globulină serică normală, cu acţiune bactericidă foarte puternică. Este o gamaglobulină înrudită cu imunoglobulinele şi are g m 1200 kD. Acţiunea sa litică asupra bacteriilor se exercită în asociaţie cu sistemul complement şi în prezenţa ionilor de Mg^{2+}. Properdina inhibă multiplicarea bacteriilor pe care nu le lizează şi a virusurilor. Se pare că properdina reprezintă un complex de anticorpi naturali ce se formează în cursul vieţii ca rezultat al stimulărilor cu antigene ale microbiotei normale a organismului;

– sistemul complement (alexina) este un grup complex de enzime din serul normal care se activează în cascadă în asociaţie cu complexele antigen-anticorp şi cu properdina. Efectul activării sale este bacterioliza şi hemoliza;

– interferonul este un sistem molecular proteic, cu rol protector antiviral, căruia i s-au demonstrat proprietăţi antitumorale.

– proteina C reactivă (CRP) este unul din reactanţii de „fază acută". Denumirea de „proteină C reactivă" derivă de la faptul că precipită polizaharidul C al pneumococului. Este o glicoproteină cu g m 110–140.000. Este alcătuită din 5–6 subunităţi legate necovalent (inelar), într-un pentamer sau hexamer. Se inactivează prin încălzirea serului la 65°, timp de 30 min. Face parte din mijloacele nespecifice de apărare a organismului, fiind prezentă la toate vertebratele şi chiar la unele nevertebrate. Este cel mai semnificativ reactant de fază, alături de α_1 – glicoproteina acidă. Se sintetizează în ficat şi nu traversează bariera placentară. Se aseamănă cu imunoglobulinele prin capacitatea ei de a lega antigenul, prin secvenţa de aminoacizi, dar se deosebeşte prin structura moleculară, modul de combinare cu antigenul şi prin sediul sintezei sale.

Funcţia CRP este de a epura unele antigene moleculare exogene (mai ales bacteriene) şi produşii rezultaţi în procesele inflamator-destructive. Se complexează cu structuri antigenice celulare. Complexarea cu antigenele este dependentă de Ca^{2+} şi favorizează eliminarea lor prin activarea complementului, prin stimularea captării şi metabolizării hepatice şi splenice, a antigenelor sau prin efectul său opsonizant. CRP activează complementul pe ambele căi. Participă la reacţiile de aglutinare şi precipitare. Inhibă limfocitele T supresoare, prin intermediul receptorilor pentru Fc de la suprafaţa lor.

În serul indivizilor sănătoşi, CRP se găseşte în concentraţie foarte mică (sub 1 mg%), decelabilă prin R I A. În condiţii patologice, valoarea CRP creşte foarte rapid, în 12–24 ore, de peste 300 de ori faţă de normal, atât în ser cât şi în diferite lichide biologice: lichidul pleural, articular, cefalorahidian. Nivelul crescut al CRP reflectă desfăşurarea unui proces inflamator-distructiv, infecţios sau neinfecţios.

Concentraţia CRP creşte în infecţiile bacteriene acute sau cronice, localizate sau generalizate, în procese inflamatorii asociate cu necroza (infarct, neoplazii), în afecţiuni reumatice şi colagenoze (reumatism poliarticular acut, poliartroză reumatoidă, lupus eritematos diseminat), în meningite, în unele viroze.

Sisteme celulare implicate în rezistenţa nespecifică antiinfecţioasă

Rezistenţa antiinfecţioasă a organismului uman şi animal este rezultatul intervenţiei unor sisteme celulare care acţionează în virtutea unor mecanisme independente de caracterul nonself al unei substanţe sau al unui agent infecţios. În cazul în care mecanismele de rezistenţă naturală, enumerate anterior au fost depăşite şi microorganismul sau virusul a pătruns într-un ţesut, procesul infecţios este stopat de intervenţia celulelor *sistemului fagocitar*.

Sistemul fagocitar include celule de origine mezodermică, distribuite difuz în întregul organism, dotate cu proprietatea comună de a îngloba moleculele nonself, virusurile şi celulele străine şi de a le distruge prin procese enzimatice de digestie intracelulară.

Fenomenul de fagocitoză (*phagein = a mânca*) a fost descoperit de *Ilia Metchnikoff** (1882). El a dat denumirea generică de „fagocite", celulelor circulante libere sau fixate în ţesuturi care înglobează particule străine.

Sistemul fagocitar cuprinde două tipuri de fagocite „profesioniste":

1) Celulele sistemului mononuclear;

2) Celulele sistemului polimorfonuclear.

Celulele sistemului fagocitar mononuclear cooperează funcţional cu celulele sistemului *imunocitar* în elaborarea răspunsului imun specific.

Conceptul SFM a fost propus în 1969 de *Langevoort* şi elaborat de către *van Furth* în 1972, sub egida OMS. Până la delimitarea acestui concept funcţional, s-au folosit, succesiv, 3 sisteme de clasificare a fagocitelor. Metchnikoff a împărţit fagocitele („celule care mănâncă") în două categorii:

– microfage (polimorfonucleare) care fagocitează particule mici;

– macrofage, cele care înglobează particule mari, chiar celule întregi.

În 1924, Aschoff a creat *sistemul reticuloendotelial* (SRE) care reuneşte celule cu o serie de funcţii comune (înglobează coloranţii vitali şi particulele de carbon). Sistemul include celule care diferă calitativ şi cantitativ sub aspectul proprietăţilor morfologice, funcţionale şi al originii lor. În afară de macrofagele propriu-zise, SRE grupa şi celulele reticuloendoteliale ale sinusurilor limfatice ganglionare, celulele reticulare ale sinusurilor venoase din splină şi ganglioni, fibroblastele, celulele endoteliale ale vaselor sanguine şi limfatice. Reevaluarea acestui sistem a fost impusă de faptul că ultimele două categorii de celule nu fagocitează.

În 1927 Voltera a propus denumirea *sistem reticulohistiocitar* (SRH). Denumirea este folosită uneori şi astăzi.

SFM grupează într-un sistem unitar, celulele mononucleare care au capacitatea de a fagocita, precum şi celulele de origine ale fagocitelor mononucleare, *celulele stem* (stem, (englez) = matcă, de origine, primordial).

Celula stem este celula cap de serie, localizată în măduva osoasă, neidentificată. Este nediferenţiată, cu o înaltă activitate mitotică, mărind astfel considerabil populaţia celulelor stem. Este pluripotentă (după unii, totipotentă). Ea va genera nu numai precursorii macrofagelor ci şi pe aceia ai eritrocitelor, polimorfonuclearelor, megacariocitelor. Pe măsură ce se divid, descendenţii celulei stem îşi pierd potenţialitatea de diferenţiere multiplă şi vor deveni precursori separaţi ai liniei monocitare, polimorfonucleare, eritrocitare, plachetare.

Prima celulă identificată pe linia de diferenţiere a fagocitelor mononucleare este *monoblastul*. Este capabil de fagocitoză şi aderă la suportul de sticlă. Pe suprafaţa sa are receptori pentru Fc. Se distinge de mieloblast (linia de diferenţiere a polimorfonuclearelor).

Promonocitul, localizat ca şi monoblastul în măduva osoasă, este mai mare decât precursorul său (15 μm), nucleul este dantelar, citoplasma acidofilă bogată în poliribosomi. Granulaţiile azurofile conţin mieloperoxidază.

---

* Metchnikoff a observat că celulele amoeboide ale crustaceului *Daphnia* ingeră sporii levurii *Metchnikowia (Monospora) bicuspidata*. Rezultatul infecţiei depinde de raportul numeric dintre fagocite şi spori. El a extins cercetările asupra organismelor superioare şi a descoperit că fagocitoza este un mecanism foarte eficient de apărare la toate organismele.

Promonocitul se maturează şi rezultă *monocitul*. În 60 ore de la formare, monocitul se eliberează în sânge şi devine o celulă circulantă pentru circa 24 ore, după care migrează spre un focar de inflamaţie. În lipsa acestuia, monocitul migrează întâmplător într-un ţesut, unde devine macrofag rezident şi îşi îmbogăţeşte echipamentul enzimatic.

Redăm mai jos categoriile de celule ale liniei de diferenţiere a sistemului fagocitar şi distribuţia lor în cele 3 compartimente: medular, sanguin şi tisular:

Tipul de celulă	*Localizarea*
Celula stem (de origine) Monoblastul Promonocitul Monocitul	În măduva osoasă
Monocitul circulant	În sânge
Macrofagul interstiţial	Histiocitul din ţesutul conjunctiv din ţesutul limfoid din măduva osoasă din plămâni din seroase
Osteoclastul*	
Microglia**	
Macrofagul intravascular sau juxtavascular	Celulele Kupffer Histiocitul din pulpa roşie a splinei din măduva osoasă din sinusurile ganglionare

* Osteoclastul (în ţesutul osos) s-ar forma prin fuziunea mai multor monocite.
** Microglia (în sistemul nervos central) pare să aibă origine monocitară. Un argument indirect în acest sens este faptul că microglia nu se evidenţiază înainte de formarea vaselor sanguine.

În SFM nu intră celulele reticuloendoteliale pentru că nu au potenţial fagocitar ridicat, nu au aceiaşi origine cu a celulelor SFM, nu fagocitează complexe imune (nu au capacitatea de imunofagocitoză pentru că nu au receptori pentru regiunea Fc a imunoglobulinelor). Nu intră, de asemenea, celulele dendritice din plasmă şi din ganglionii limfatici, deoarece au capacitatea de a fixa antigenul numai pe suprafaţa lor, dar nu fagocitează.

Din punctul de vedere al localizării se disting:

– fagocite mononucleare *tisulare* care reunesc histiocitele din ţesutul conjunctiv, din ţesutul limfoid (macrofage libere şi fixe), din măduva osoasă, din plămâni (macrofage alveolare), din cavităţile seroase (macrofagele din pleură şi peritoneu, macrofagele din articulaţii);

– fagocite mononucleare *intravasculare* sunt acelea care au contact fie cu sângele (celulele Kupffer, histiocitele din cordoanele pulpei roşii splenice etc.) fie cu limfa (macrofagele intra- şi extrasinusoidale din ganglionii limfatici).

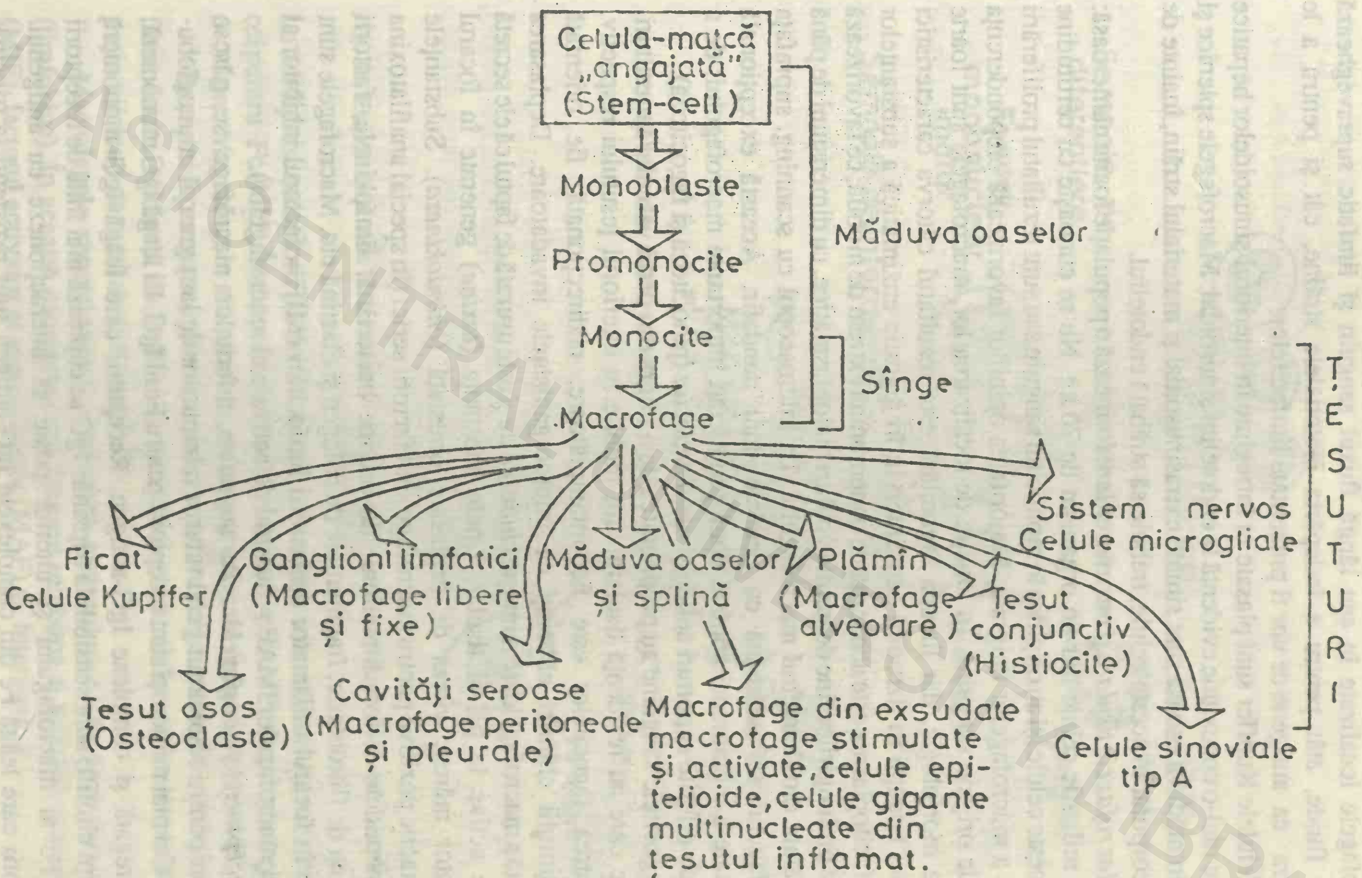


Fig. 68. Celulele sistemului fagocitar mononuclear şi distribuţia lor în organism

Macrofagele localizate în sau lângă fluxul sanguin şi limfatic supraveghează aceste fluide, atât pentru a îndepărta materialele străine, cât şi pentru a le prelucra ca antigene ce vor fi prezentate limfocitelor.

Celulele Kupffer sunt plasate în întregime în interiorul sinusoidelor hepatice şi nu au nici-o conexiune evidentă la endoteliul sinusoidal. Macrofagele splenice şi cele din măduva osoasă sunt situate extrasinusoidal şi materialul străin, înainte de a fi încorporat în aceste celule, trebuie să străbată endoteliul.

Macrofagele tisulare şi intravasculare formează o populaţie foarte numeroasă: 17–20 miliarde celule într-un organism de 70 kg. Nu se cunoaşte cu certitudine dacă aceste celule îşi au originea în monocitul sanguin sau sunt rezultatul proliferării *in situ* a macrofagelor imigrate. Majoritatea opiniilor favorizează preponderenţa celor de origine sanguină. În funcţie de localizarea lor, macrofagele sunt foarte diverse morfologic, dar funcţia fagocitară este rezultatul câtorva caracteristici comune: bogăţia în lizosomi care intervin în digestia enzimatică a substanţelor nonself; citoplasma este acoperită de o membrană extrem de mobilă, ce favorizează apariţia prelungirilor fine denumite voaluri hialoplasmatice, cu dimensiuni de până la jumătate din diametrul macrofagului. La microscopul cu scanning, suprafaţa macrofagului se aseamănă cu petalele unui trandafir. Această excepţională mobilitate a membranei conferă două proprietăţi importante macrofagului: de a *adera* de diferite suporturi solide şi de a *endocita* (pinocitoză şi fagocitoză).

Fagocitele sanguine au proprietatea de a migra din patul vascular în ţesuturi, iar cele care au rezidenţă tisulară sunt mobile în interiorul ţesutului respectiv. Deplasarea fagocitelor este fie întâmplătoare, nedirecţionată, fie orientată spre stimulii chimici eliberaţi de microorganismele invadatoare. Deplasarea orientată a macrofagelor se numeşte *chimiotaxie* şi este uşurată de faptul că ele secretă enzime active la pH-ul tisular. Unele substanţe (*taxine*) generate în focarul inflamator măresc viteza de deplasare orientată (*chimiokineza*). Substanţele chimiotactic pozitive pentru macrofage sunt factorii serici (în special anafilatoxina C5a), peptidele N-formil-metionil de origine bacteriană, limfokinele, factorii sintetizaţi de fibroblaste, fragmentele de colagen şi elastină etc. Macrofagele sunt reţinute în focarul inflamator de factorii limfocitari (MIF = factorul inhibitor al migrării macrofagelor; MAF = factorul de activare al macrofagelor).

Receptorii macrofagelor. Pe suprafaţa diferitelor macrofage se găsesc receptori pentru segmentul Fc al tuturor izotipurilor de lanţ greu al imunoglobulinelor. Cei mai numeroşi sunt receptorii pentru Fc al IgG. Ei leagă IgG monomeră, IgG agregată şi complexe IgG-antigen. Receptorii care leagă IgG monomeră (anticorpi citofili) sunt sensibili la tripsină. IgG se cuplează mai întâi de receptorii pentru Fc ai macrofagului şi ulterior poate să interacţioneze cu antigenul. Receptorii care leagă Fc din complexele IgG-antigen sunt rezistenţi la tripsină.

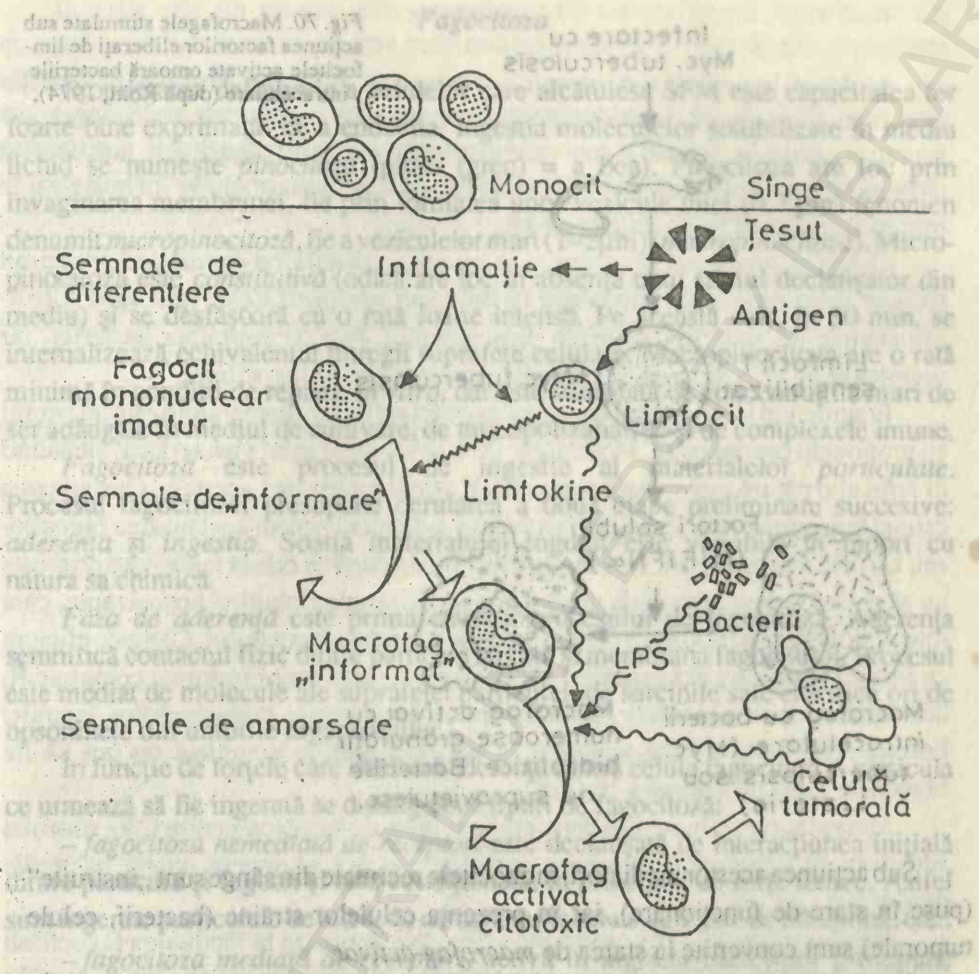


Fig. 69. Etapele implicate în dezvoltarea macrofagelor activate (după Meltzer, modificată de Shatma, 1986).

La om lipsesc receptorii pentru Fc al IgG_3. Un număr semnificativ de receptori sunt cei pentru Fc al IgE. În timpul fagocitozei, receptorii pentru Fc dispar şi reapar după 6–24 ore. Macrofagele alveolare au un număr mare de receptori pentru Fc al IgA.

Receptorii pentru *complement* sunt cei pentru fragmentele C5a şi C3b, ultimii fiind foarte eficienţi ca mediatori ai legării particulelor opsonizate, dar mai puţin eficienţi ca mediatori ai ingestiei.

Macrofagele recepţionează mediatorii moleculari ai limfocitelor activate (limfokine). În această categorie intră factorul inhibitor al migrării macrofagelor (MIF), factorul activator al macrofagelor (MAF) şi interferonul.

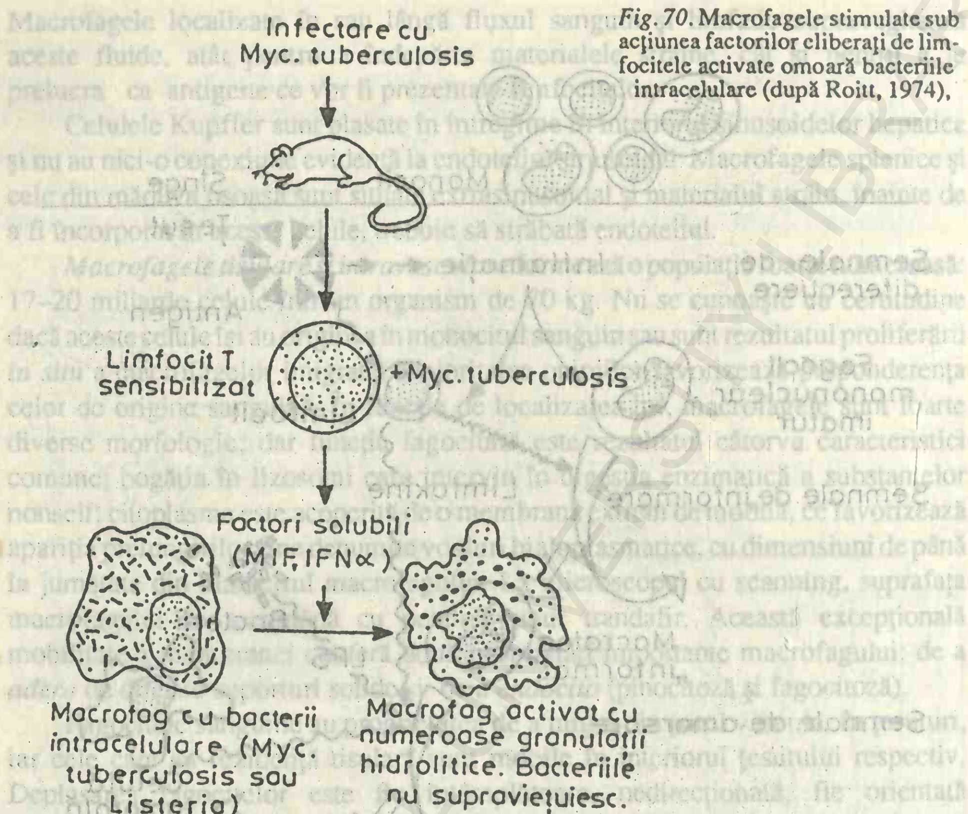


Fig. 70. Macrofagele stimulate sub acțiunea factorilor eliberați de limfocitele activate omoară bacteriile intracelulare (după Roitt, 1974).

Sub acțiunea acestor mediatori, monocitele recrutate din sânge sunt „instruite" (puse în stare de funcționare), iar în prezența celulelor străine (bacterii, celule tumorale) sunt convertite la starea de *macrofag activat*.

Pe suprafața macrofagului se găsesc receptori pentru hormoni (de exemplu, receptorul pentru insulină), precum și receptori pentru glicoproteinele care au glucide terminale cu resturi de fucozil, manozil, glucozil sau N-acetil-glucozamină. Ultimii sunt foarte importanți în procesul de recunoaștere a celulelor străine, a eritrocitelor îmbătrânite, a fungilor și bacteriilor.

Macrofagele au receptori pentru proteinele care conțin fier, ceea ce explică rolul macrofagului în metabolismul fierului. Receptorii pentru *fibronectină* ar putea fi implicați în aderența monocitelor la zonele de discontinuitate ale endoteliului vascular, dar și în ingestia particulelor învelite (opsonizate) cu fibronectină. Macrofagele au receptori pentru lectine (concanavalina A, aglutinina din grâul germinat).

Fagocitoza

Proprietatea definitorie a celulelor care alcătuiesc SFM este capacitatea lor foarte bine exprimată de a endocita. Ingestia moleculelor solubilizate în mediu lichid se numeşte *pinocitoză* (pinos (grec) = a bea). Pinocitoza are loc prin invaginarea membranei, fie prin formarea unor vezicule mici (0,2 μm) fenomen denumit *micropinocitoză*, fie a veziculelor mari (1–2μm) (*macropinocitoză*). Micropinocitoza este *constitutivă* (adică are loc în absenţa unui stimul declanşator din mediu) şi se desfăşoară cu o rată foarte intensă. Pe această cale, în 30 min. se internalizează echivalentul întregii suprafeţe celulare. Macropinocitoza are o rată minimă în condiţii de repaus, *in vitro*, dar este stimulată de concentraţiile mari de ser adăugate în mediul de cultivare, de mucopolizaharide şi de complexele imune.

Fagocitoza este procesul de ingestie al materialelor *particulate*. Procesul fagocitozei presupune derularea a două etape preliminare succesive: *aderenţa* şi *ingestia*. Soarta materialului ingerat este variabilă în raport cu natura sa chimică.

Faza de aderenţă este prima etapă a procesului de fagocitoză. Aderenţa semnifică contactul fizic dintre particula străină şi membrana fagocitului. Procesul este mediat de molecule ale suprafeţei particulei, de sarcinile sale electrice ori de opsoninele din umorile organismului.

În funcţie de forţele care mediază aderenţa dintre celula fagocitară şi particula ce urmează să fie ingerată se disting două tipuri de fagocitoză:

– *fagocitoza nemediată de receptori* este declanşată de interacţiunea iniţială dintre particulă şi fagocit şi este condiţionată, în principal, de forţe ionice. Astfel sunt ingerate particulele de latex, de carbon, moleculele agregate de albumină, etc.;

– *fagocitoza mediată de receptori*, activă în ingestia bacteriilor presupune interacţiunea moleculelor de suprafaţă ale celulei bacteriene şi ale fagocitului. Este mult mai eficientă. Receptorii fagocitului sunt de două feluri: specifici şi nespecifici. Particulele care au pe suprafaţa lor carbohidraţi se leagă la *receptorii nespecifici* de carbohidraţi ai fagocitului, fie direct, fie prin intermediul lectinelor extracelulare, care funcţionează ca punţi de legare încrucişată între oligozaharidele suprafeţei bacteriene şi ale fagocitului.

De cele mai multe ori interacţiunea dintre celula fagocitară şi bacterie este mediată de *receptori specifici*. Fagocitele recunosc şi leagă cu uşurinţă bacteriile opsonizate. Toate *opsoninele* acţionează în sensul legării celulei bacteriene de suprafaţa fagocitului şi stimulează ingestia sa.

Moleculele opsonizante (opsein = a aduce de mâncare) favorizează ingestia unei particule de către o celulă fagocitară. Proteinele şi peptidele serice tapetează suprafaţa celulei bacteriene şi sunt recunoscute de receptorii fagocitului, funcţionând ca punţi de legătură între fagocit şi celula bacteriană. Opsoninele au rol hotărâtor în intensificarea procesului de fagocitoză.

Cele mai importante opsonine sunt *anticorpii specifici* şi *peptidele* derivate din *fixarea complementului*. Anticorpii opsonizanţi aparţin claselor IgG, IgM şi IgA. Moleculele de anticorpi se leagă prin regiunile Fab de suprafaţa bacteriei, iar segmentul Fc este recunoscut de receptorii specifici ai fagocitului.

Fragmentul C3b rezultat din cascada de fixare a complementului este un peptid cu proprietăţi opsonizante. Moleculele de C3b învelesc celula bacteriană, alcătuind în jurul ei o pătură moleculară şi rezultatul este imobilizarea acesteia. Opsonizarea celulei bacteriene cu C3b nu este totdeauna suficientă pentru declanşarea fagocitozei. De cele mai multe ori, ingestia sa este iniţiată după ce celula fagocitară primeşte un al doilea semnal, transmis de moleculele de imunoglobuline opsonizante, care interacţionează cu receptorii pentru Fc de pe suprafaţa fagocitului. C3b este eficient ca factor opsonizant al bacteriilor Gram negative care cresc în forme coloniale R, deoarece lipopolizaharidele lor sunt lipsite de lanţurile polizaharidice laterale. Formele coloniale S care sintetizează lipopolizaharide complete nu pot să fie fagocitate după opsonizarea cu C3b.

Macrofagele activate au o densitate mai mare de receptori pentru C3b, sunt mai aderente, au proprietăţi fagocitare superioare şi pot să ingere numai bacteriile opsonizate cu C3b.

Rolul opsonizant al fragmentului C3b nu se limitează la facilitarea fagocitării celulelor bacteriene, ci se extinde şi ca mediator al altor interacţiuni: C3b intensifică citotoxicitatea mediată de anticorpi.

Ingestia unei particule opsonizate cu C3b poate fi stimulată de fibronectină, care funcţionează ca o punte de legătură între celula bacteriană şi receptorul pentru fibronectină al celulei fagocitare.

Faza de ingestie este condiţionată de mobilitatea receptorilor de pe suprafaţa fagocitului. După invaginarea membranei sale, vacuola formată trebuie să se închidă asemenea unui fermoar. Dacă receptorii fagocitului nu sunt suficient de mobili, sau dacă ligandul (moleculele de pe suprafaţa particulei ingerate, recunoscute de receptori) nu prezintă un număr suficient de grupări de interacţiune cu receptorii fagocitului, ingestia nu are loc.

Ingestia este un proces activ, dependent de metabolismul fagocitului. Ea necesită o cantitate mare de energie, furnizată prin procese intense de glicoliză şi este influenţată de temperatură.

Capacitatea macrofagelor de a ingera complexe imune (mediată de receptorii pentru Fc şi C3b) se numeşte *imunofagocitoză*.

Odată formată, vacuola de fagocitoză este orientată spre aria perinucleară, de către tubulii contractili din citoplasmă. Aici, vacuola primară, după fuziunea cu lizosomii devine *fagolizosom*.

Dacă patricula înglobată este o bacterie, după ingestie există următoarele posibilităţi de evoliţie: *digestia, persistenţa, multiplicarea, distrugerea reciprocă, liza fagocitului* şi *păstrarea viabilităţii microorganismului*.

Digestia corespunde situaţiei în care celula bacteriană este degradată de enzimele lizosomale, în număr de peste 40, active la pH acid. Rezultă molecule

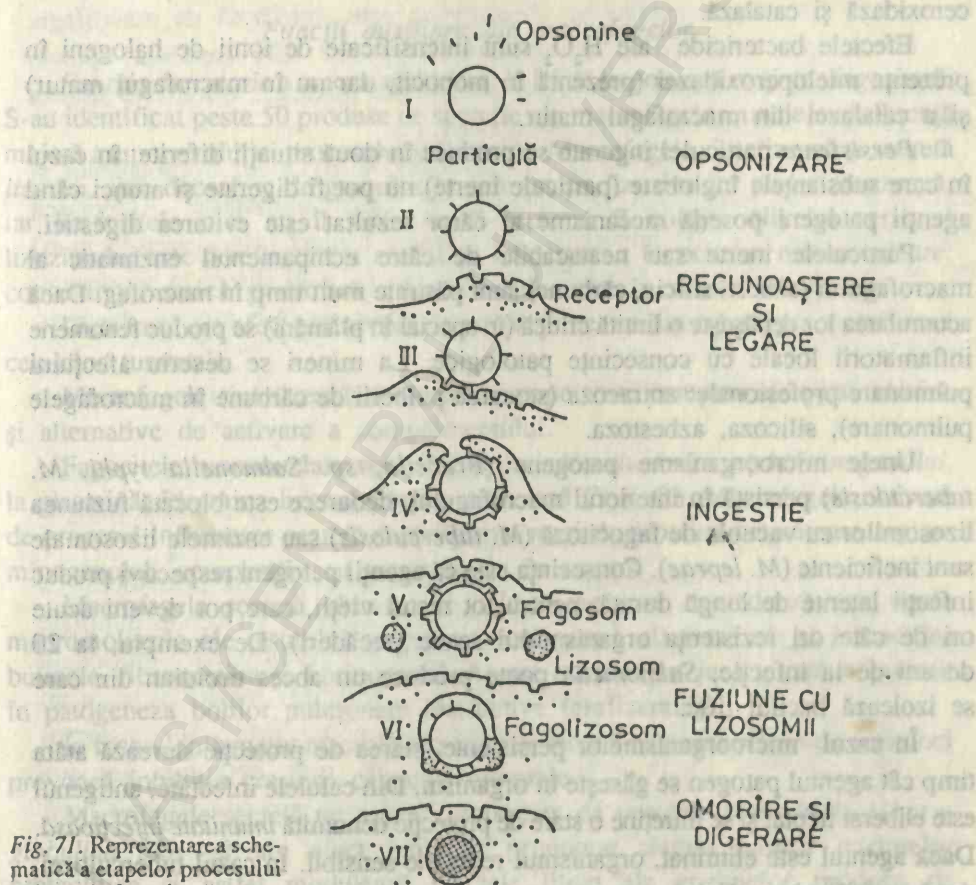


Fig. 71. Reprezentarea schematică a etapelor procesului de fagocitoză

mici (de circa 200 D), care trec în citoplasma fagocitului. Simultan sunt digerate şi proteinele membranare ale vacuolei de fagocitoză, iar receptorii din membrană sunt recirculaţi spre suprafaţa celulei pentru a-şi relua ciclul.

După ingestia bacteriei are loc o *creştere bruscă* a *intensităţii respiraţiei* macrofagului. Creşte consumul de O_2, de glucoză şi se activează oxidaza membranară dependentă de NADPH. Oxidaza reduce O_2 la O_2^- (amionul superioxid), care este dismutat de superoxid-dismutază (SOD) la H_2O_2.

O parte din H_2O_2 este descompusă sub acţiunea glutation-peroxidazei, reacţie în care glutationul este oxidat. Glutation-reductaza regenerează glutationul redus. Procesul este însoţit de oxidarea NADPH, furnizat de şuntul hexozomonofosfatului. Metaboliţii reactivi ai O_2 exercită efecte bactericide şi antitumorale. Macrofagul este protejat de efectele lor toxice, de către glutation-ceroxidază şi catalază.

Efectele bactericide ale H_2O_2 sunt intensificate de ionii de halogeni în prezenţa mieloperoxidazei (prezentă în monocit, dar nu în macrofagul matur) şi a catalazei din macrofagul matur.

Persistenţa particulei ingerate se produce în două situaţii diferite: în cazul în care substanţele înglobate (particule inerte) nu pot fi digerate şi atunci când agenţii patogeni posedă mecanisme al căror rezultat este evitarea digestiei.

Particulele inerte sau neatacabile de către echipamentul enzimatic al macrofagului (azbest, siliciu, cărbune) sunt păstrate mult timp în macrofag. Dacă acumularea lor depăşeşte o limită critică (în special în plămâni) se produc fenomene inflamatorii locale cu consecinţe patologice. La mineri se descriu afecţiuni pulmonare profesionale: antracoza (stocarea pulberii de cărbune în macrofagele pulmonare), silicoza, azbestoza.

Unele microorganisme patogene (*Brucella, sp. Salmonella typhi, M. tuberculosis*) persistă în interiorul macrofagului, deoarece este blocată fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoză (*M. tuberculosis*) sau enzimele lizosomale sunt ineficiente (*M. leprae*). Consecinţa este că agenţii patogeni respectivi produc infecţii latente de lungă durată, pentru tot restul vieţii, care pot deveni acute ori de câte ori rezistenţa organismului scade (recăderi). De exemplu, la 20 de ani de la infecţie, *Salmomella* poate produce un abces tiroidian din care se izolează bacilul tific.

În cazul microorganismelor persistente, starea de protecţie durează atâta timp cât agentul patogen se găseşte în organism. Din celulele infectate, antigenul este eliberat treptat şi se întreţine o stare de protecţie denumită *imunitate infecţioasă*. Dacă agentul este eliminat, organismul redevine sensibil. În cazul tuberculozei, după însănătoşirea clinică, organismul nu se sterilizează, deoarece *M. tuberculosis* supravieţuieşte în interiorul fagocitelor.

În unele cazuri are loc *multiplicarea* microorganismelor în macrofag: *M. leprae, M. tuberculosis* (la unii bolnavi de tuberculoză), *Salmonella, Lysteria monocytogenes, Brucella,* fungii *Candida* şi *Histoplasma*, protozoarele *Plasmodium, Toxoplasma* sp., *Tripanosoma* sp., *Pneumocystis* sp.

Celulele infectate conţin cantităţi mari de microorganisme. Tratamentul acestor infecţii se face numai cu substanţe chimice care pătrund în interiorul celulei (coloranţi care, *in vivo,* pătrund în celule şi au efecte bacteriostatice). Nu pot fi utilizate antibioticele, deoarece ele se acumulează în lizosomi, iar agenţii patogeni persistă în celulă prin efectul blocant al fuziunii între lizosomi şi vacuola fagocitară.

Prin funcţia sa fagocitară, macrofagul reprezintă ultima barieră protectoare faţă de infecţie. Dacă această barieră este depăşită, infecţia se extinde şi evoluează spre septicemie şi generalizare.

Funcţii auxiliare ale macrofagelor

Funcţia secretorie a macrofagelor este la fel de importantă ca şi cea fagocitară. S-au identificat peste 50 produse de secreţie ale macrofagelor, unele cu influenţă majoră asupra evoluţiei procesului inflamator. Macrofagele sintetizează şi secretă *lizozim*, spre deosebire de granulocite care conţin lizozim dar nu-l sintetizează, iar limfocitele nici nu îl sintetizează nici nu îl conţin. Nivelul seric al lizozimului este o reflectare a activităţii fagocitare a fagocitelor mononucleare: concentraţia serică şi urinară a lizozimului creşte în stările infecţioase.

Lizozimul are efect antineoplazic prin acţiunea sa directă asupra membranei celulelor tumorale.

Macrofagele sintetizează şi secretă aproape toate componentele căii clasice şi alternative de activare a complementului.

Fagocitele mononuclare secretă o *proteină activatoare a plasminogenului*, la plasmină. Plasmina lizează fibrina, activează Cl şi C3. Macrofagele activate de procesul inflamator secretă cantităţi mai mari de proteină activatoare a plasminogenului, comparativ cu macrofagele în repaus.

Macrofagele secretă *elastaza şi colagenaze* care degradează atât unele macromolecule ale ţesutului conjunctiv (colagenul, elastina) cât şi imunoglobulinele, fibronectina şi fibrinogenul. Aceste enzime pot juca un rol important în patogeneza bolilor pulmonare distructive (emfizemul).

În focarul inflamator macrofagele activate secretă *arginaza.* Depleţia argininei provoacă inhibiţia creşterii celulelor tumorale.

Macrofagele secretă un număr important de proteine plasmatice. *Macroglobulina alfa -2* are efect inhibitor pronunţat asupra tuturor enzimelor proteolitice şi astfel modulează efectele litice ale enzimelor produse de

macrofage: *Fibronectina*, cu rol structural în membrana bazală, dar şi în alte ţesuturi conjunctive este produsă de macrofage. Unele *proteine ale cascadei de coagulare* sanguină sunt sintetizate în fagocitele mononucleare.

Macrofagele sintetizează compuşi neproteici din categoria prostaglandinelor (lipide bioactive) ca şi *factori reglatori ai răspunsului imun* (interleukina 1, considerată şi ca factor pirogen endogen).

În focarul inflamator, macrofagele secretă factorul stimulator *al angiogenezei*.

Macrofagele participă la *metabolismul Fe*. Hematiile sunt distruse de macrofagele splenice în momemntul în care rezerva lor de ATP s-a epuizat. Macrofagul preia Fe din hemoglobină şi îl cedează transferinei, care îl transportă la locul de formare a hematiilor. *Transferina* este sintetizată de macrofage.

Macrofagele participă la *metabolismul lipidelor*. Ele captează lipidele plasmatice şi le degradează sub acţiunea lipazelor proprii. Participă la sinteza colesterolului, a unor substanţe carotenoide etc.

Macrofagele eliberează un factor stimulator al diviziunii fibroblastelor şi concomitent, al biosintezei de colagen de către fibroblaste. Activitatea fibrobalastelor este foarte importantă în repararea tisulară (vindecarea leziunii) într-un proces inflamator. Macrofagele participă în mod direct la vindecare, prin înglobarea şi distrugerea resturilor de celule tisulare moarte, bacterii, leucocite nefuncţionale.

În infecţia virală, macrofagele sintetizează o substanţă cu rol protector: interferonul.

Funcţia citotoxică a macrofagului. Macrofagele pot să omoare celulele tumorale prin mecanisme nefagocitare. Citotoxicitatea faţă de celulele maligne se poate manifesta prin câteva mecanisme distincte.

Citotoxicitatea specifică a macrofagelor a fost evidenţiată prin faptul că macrofagele peritoneale recoltate de la şoarecele imunizat cu celule tumorale singenice*, au efecte citolitice faţă de celulele tumorale *in vitro*. Limfocitele T ale organismului imunizat cu celule tumorale „armează" macrofagele cu un factor care este adsorbit atât pe celulele ţintă cât şi pe macrofag. Supernatantul limfocitelor recoltate de la şoarecele imunizat cu celule tumorale, *in vivo* stimulează specific efectul citotoxic al macrofagelor. Este necesar contactul intim dintre macrofag şi celula ţintă, dar factorul litic nu se cunoaşte.

---

* Organismele *singenice* aparţin aceleiaşi linii inbred. Ele sunt identice din punct de vedere genetic. Pe suprafaţa celulelor prezintă deasemenea molecule CMH identice.

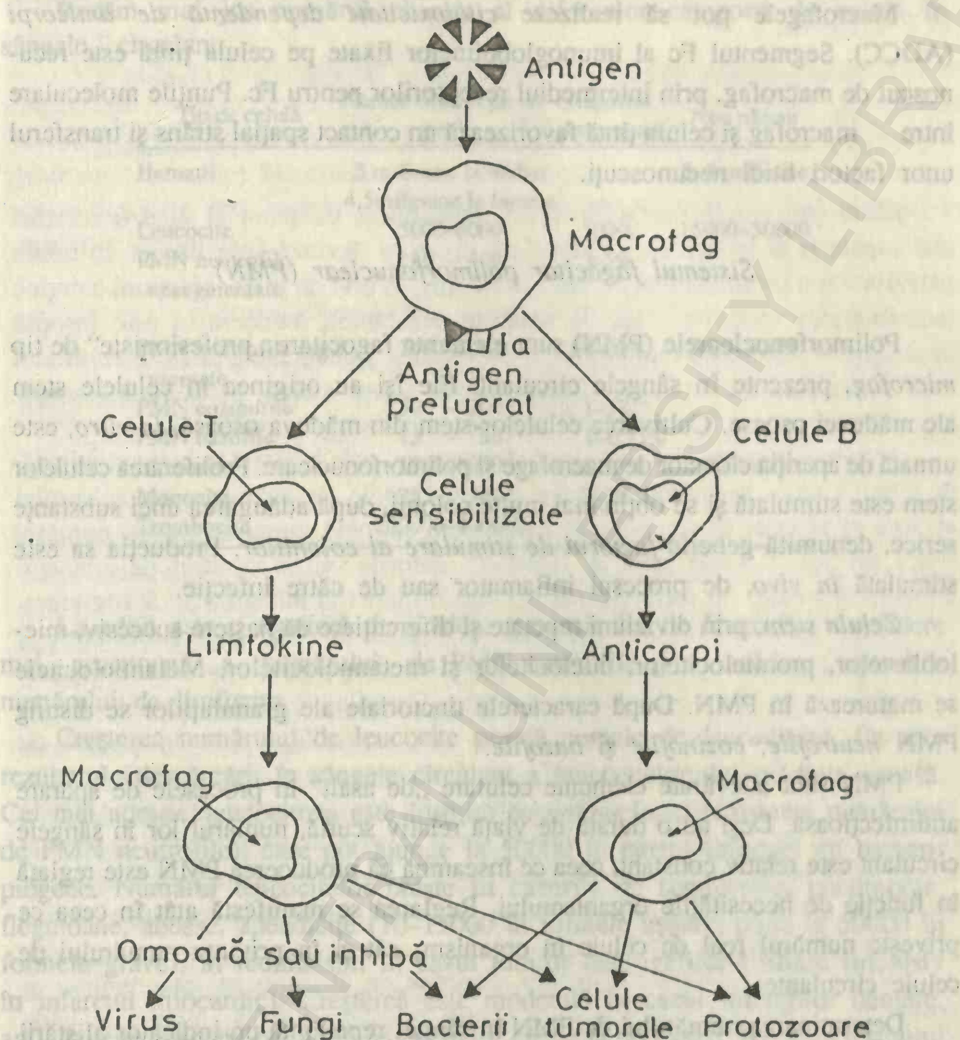


Fig. 72. Reprezentarea schematică a interacțiunii macrofagelor cu limfocitele T și B, în inducția răspunsului imun. Macrofagele activate au efect bactericid și citotoxic față de celulele neoplazice (după Sharma, 1986).

Macrofagele au activitate *citotoxică naturală*, nespecifică, exprimată la un nivel mult mai scăzut decât citotoxicitatea specifică. Efectul s-a demonstrat *in vitro*, prin contactul macrofagelor cu celule alogenice și se intensifică după activarea nespecifică a macrofagelor de către diferiți factori chimici sau biologici. Activitatea litică pare a fi consecința secreției unei proteaze neutre de către macrofage (Cameron, 1982).

Macrofagele pot să realizeze *citotoxicitate dependentă de anticorpi* (ADCC). Segmentul Fc al imunoglobulinelor fixate pe celula țintă este recunoscut de macrofag, prin intermediul receptorilor pentru Fc. Punțile moleculare între macrofag și celula țintă favorizează un contact spațial strâns și transferul unor factori litici necunoscuți.

Sistemul fagocitar polimorfonuclear (PMN)

Polimorfonuclearele (PMN) sunt elemente fagocitare „profesioniste" de tip *microfag*, prezente în sângele circulant. Ele își au originea în celulele stem ale măduvei osoase. Cultivarea celulelor-stem din măduva osoasă, *in vitro*, este urmată de apariția clonelor de macrofage și polimorfonucleare. Proliferarea celulelor stem este stimulată și se obțin mai multe colonii, după adăugarea unei substanțe serice, denumită generic *factorul de stimulare al coloniilor*. Producția sa este stimulată *in vivo*, de procesul inflamator sau de către infecție.

Celula stem, prin diviziuni repetate și diferențiere dă naștere succesiv, mieloblastelor, promielocitelor, mielocitelor și metamielocitelor. Metamielocitele se maturează în PMN. După caracterele tinctoriale ale granulațiilor se disting PMN *neutrofile*, *eozinofile* și *bazofile*.

PMN sunt adevărate elemente celulare „de asalt" în procesele de apărare antiinfecțioasă. Deși au o durată de viață relativ scurtă, numărul lor în sângele circulant este relativ constant, ceea ce înseamnă că producerea PMN este reglată în funcție de necesitățile organismului. Reglarea se manifestă atât în ceea ce privește numărul real de celule în organism, cât și în privința numărului de celule circulante.

Determinarea numărului de PMN în sânge reprezintă un indicator al stării de sănătate. Creșterea numărului de PMN semnifică existența unui proces infecțios în organism, dar este indiciul unei evoluții favorabile deoarece organismul se apără față de microorganismul invadator. Scăderea numărului de PMN în cursul unei infecții semnifică de cele mai multe ori, o incapacitate de apărare a organismului.

PMN au o durată scurtă de viață: câteva zeci de ore (hematiile trăiesc 100–120 zile). La omul normal se distrug, în fiecare oră, circa 5 miliarde de leucocite și 10 miliarde hematii.

Redăm mai jos numărul absolut al diferitelor categorii de celule în sângele circelant:

Tip de celulă	Număr absolut pe un mm³	Raportul procentual	Nou născut
Hematii	5 milioane la bărbat 4,5milioane la femeie		5–8 milioane
Leucocite	5000–8000	100%	15000–50000
PMN neutrofile nesegmentate	150 - 400	3–5%	
PMN neutrofile segmentate	3000–6000	54–62%	7000-30000
PMN eozinofile	50 - 200	1–3%	
PMN bazofile	15 - 50	0–0,75%	
Limfocite	1500–3000	25–33%	2000–8000
Monocite	285 - 300	3–7%	
Trombocite	200000–400000		

La adult este o tendinţă de scădere a numărului de leucocite: o scădere mai accentuată a numărului de PMN neutrofile şi o scădere uşoară a numărului de limfocite.

Creşterea numărului de leucocite poartă numele de *leucocitoză*. Ea este rezultatul descărcării în sângele circulant a leucocitelor din măduva osoasă. Cel mai adesea, leucocitoza este însoţită de *polinucleoză* (creşterea numărului de PMN neutrofile), care pot ajunge la 50000 în cursul infecţiei cu bacterii piogene. Numărul leucocitelor creşte în cazurile de septicemie, pneumonie, flegmoane, abcese, apendicite (10–15000 în formele uşoare, până la 50000 în formele grave), în reumatism, în cazul tuturor distrugerilor tisulare (inclusiv în infarctul miocardic). Creşterea este moderată în cazul infecţiilor dentare, amigdaliene, urinare. Numărul leucocitelor creşte în neoplazii. Necroza ţesutului tumoral reprezintă un stimul pentru afluxul de leucocite.

Creşterea numărului PMN neutrofile este frecventă în infecţiile cu localizare periferică. Creşterea este rezultatul atât al unei descărcări din depozite cât şi al hiperfuncţiei medulare. Hiperfuncţia medulară se exteriorizează prin creşterea numărului de elemente tinere (nesegmentate) în sânge. Pentru fiecare neutrofil circulant, în măduva osoasă se află în rezervă 50–100 neutrofile mature.

Arneth a stabilit formula care îi poartă numele. Pentru determinarea formulei, pe un frotiu de sânge, colorat May–Grünwald – Giemsa se

înregistrează PMN neutrofile, care după numărul segmentelor nucleare se clasifică în 5 categorii:

I (nesegmentate);	II(2 segm.);	III (3 segm);	IV (4 segm.);	V (5 segm)
5%	35%	41%	17%	2% – normal
21%	65%	14%	0%	0% – apendicită

Când elementele neutrofile tinere predomină, ca semn al unei descărcări mai rapide şi al hiperfuncţiei medulare, formula deviază spre stânga. În bolile parazitare (cu protozoare şi viermi intestinali), în boli de piele, afecţiuni alergice (sensibilitatea exagerată faţă de anumite substanţe), leucocitoza este însoţită de *acidofilie* (creşterea numărului de eozinofile). Leucocitoza poate fi rezultatul unor malignităţi hematologice (leucemii). În aceste situaţii predomină elementele figurate tinere ale seriei afectate de transformarea malignă.

Scăderea numărului de leucocite (*leucopenie*) este întâlnită în infecţia gripală, în febra tifoidă, în infecţiile grave în care forţele de apărare a organismului au fost paralizate. În situaţiile de leucopenie extremă (agranulocitoză) numărul PMN neutrofile scade până la 200/mm³, datorită unor condiţii de epuizare a măduvei osoase. În astfel de cazuri, sensibilitatea la infecţii este foarte mare.

PMN sunt foarte bine echipate pentru a detecta, ingera şi distruge microorganismele invadatoare. În citoplasma lor se găsesc numeroase granule lizosomale cu un bogat echipament enzimatic. Granulaţiile PMN neutrofile aparţin la două categorii. Granulaţiile *primare* sau *azurofile*, apar în stadiul de promielocit şi înmuguresc din cisternele feţei concave a aparatului Golgi. Ele se măresc prin fuziune succesivă şi conţinutul lor devine tot mai dens. După ce formarea lor s-a încheiat şi celula trece în stadiul de mielocit, cisternele aparatului Golgi îşi inversează polaritatea şi pe faţa convexă se maturează granulaţiile *secundare* sau *specifice*. Denumirile de granulaţii primare şi secundare derivă din secvenţa apariţiei lor în celulă.

Granulaţiile *primare* (azurofile), descrise de Bainton se mai numesc şi *granulaţii A ale lui Baggiolini* şi conţin mieloperoxidază, hidrolaze acide degradative (proteaze, fosfataze, nucleotidaze, galactozidaze) şi substanţe cu acţiune bactericidă.

Granulaţiile *secundare* (specifice ale lui Bainton) sau *granulaţiile B ale lui Baggioloni* sunt mai mici, mai puţin electronodense, mai diverse ca morfologie (sferice, alungite) şi conţin fosfatază alcalină şi lizozim. Nu conţin alte enzime lizosomale. Sunt negative pentru peroxidază. Se formează când promielocitul trece în stadiul de mielocit.

Studiul granulaţiilor PMNN a fost posibil după izolarea lor din celulele acumulate în cavitatea peritoneală a iepurelui, după injectarea glicogenului

(substanţă chimiotactic pozitivă). PMNN se sparg foarte repede după o pipetare rapidă.

Granulaţiile secundare (specifice) fuzionează foarte repede cu vacuola de fagocitoză, în timp ce ea este încă deschisă în spaţiul extracelular. Din această cauză, peste 90% din conţinutul lor se varsă în lichidul extracelular. Granulaţiile primare (azurofile) fuzionează puţin mai târziu cu fagolizosomul. De aceea, circa jumătate din conţinutul lor rămâne în fagolizosom, restul trecând în spaţiul extracelular.

Sisteme bactericile active în PMN neutrofile

În PMN neutrofile funcţionează două sisteme bactericide: unul este independent de O_2, iar al II-lea este dependent de O_2.

Sistemul bactericid *independent de O_2* cuprinde o gamă largă de activităţi enzimatice (hidrolaze acide, proteaze neutre, lizozimul) cărora li se adaugă condiţii fiziologice incompatibile cu viaţa bacteriilor ingerate (mediul acid în vacuola de fagocitoză, lipsa substanţelor nutritive). Granulele neutrofilelor conţin proteine bazice (cationice), bogate în lizină, cu activitate bactericidă. Ele au fost denumite generic „fagocitine". Una dintre proteinele cu sarcină electrică pozitivă (cationică) este catepsina G, o enzimă proteolitică activă faţă de *Streptococcus, S. aureus, E. coli, Pseudomonas*. Un alt complex proteic granular determină creşterea permeabilităţii celulei bacteriene. Se consideră că proteinele cationice sunt foarte diverse, dar mecanismul lor de acţiune nu este cunoscut (Gallin, 1987). Se pare că aminoacizii cationici ai acestor proteine cedează protoni pentru a forma punţi cu componente electronegative ale suprafeţei bacteriei. Astfel, proteinele cationice sunt fixate pe suprafaţa celulei bacteriene şi afectează mecanismele de transport ale acesteia.

Proteazele neutre se găsesc în granulaţiile azurofile şi au pH optim al activităţii lor în jurul valorii 7. Cea mai cunoscută este *elastaza* şi are proprietatea de a cliva proteine foarte diverse, solubile sau structurale: fibrinogen, colagen, elastină. *Catepsina G* face parte din aceiaşi categorie. Ambele au activitate bactericidă.

Hidrolazele acide, localizate în primul rând în granulaţiile azurofile sunt reprezentate de catepsinele B, D, E şi realizează digestia finală a proteinelor. Efectul lor se manifestă mai ales extracelular, deoarece în neutrofilul cu viaţă scurtă, digestia celulei bacteriene nu atinge etapele finale.

Lizozimul este o enzimă bactericidă din granulele secundare ale neutrofilelor. Este o muramidază: atacă mureina din peretele bacterian, prin scindarea legăturilor glicozidice beta 1–4 din lanţurile polizaharidice ale mureinei, dintre resturile de N-acetilglucozamină şi acidul N-acetilmuramic. Rezultă dizaharide

ale compuşilor menţionaţi, la care se găsesc ataşate lanţurile peptidice. După distrugerea structurii de rezistenţă a peretelui, celula bacteriană aflată într-un mediu neprotejat osmotic se lizează. Efectul lizozimului este deosebit de eficient asupra peretelui bacteriilor Gram pozitive (*Micrococcus lysodeikticus*, asupra căruia efectul s-a descoperit), la care mureina reprezintă 50–80% din conţinutul peretelui. Eficienţa lizozimului este mult diminuată asupra peretelui bacteriilor Gram negative, care are o cantitate mică de mureină, mascată de lipidele de suprafaţă. Lizozimul este eficient după tratamentul prealabil al celulelor cu un amestec generator de radicali activi (acid ascorbic şi H_2O_2).

Lizozimul are acţiune bacteriostatică. Perturbă fenomenele de oxidoreducere bacteriană şi astfel blochează procesele de creştere şi diviziune. Lizozimul se găseşte în ambele categorii de granule.

Mediul acid din fagolizosom este un factor cu efect bactericid. În vacuola de fagocitoză pH scade rapid (în câteva minute) prin producerea lactatului (din metabolismul anaerob al glucozei). Mediul acid este necesar activităţii unor enzime granulare.

Lactoferina este o proteină din granulele secundare ale neutrofilelor care leagă Fe şi astfel inhibă activităţile vitale ale bacteriei, dependente de Fe.

Sistemul bactericid dependent de O_2 este complex şi esenţial pentru funcţia neutrofilelor. Imediat după ingestia unei bacterii, în neutrofil se produce o intensificare bruscă a respiraţiei, o adevărată explozie a acestui proces. O_2 este necesar pentru activitatea bactericidă optimă. Intensificarea respiraţiei se realizează pe seama creşterii consumului de O_2 şi este însoţită de producerea intermediarilor săi reactivi: $^1O_2$ (oxigen singlet), O_2^- (radical superoxid), $OH^•$ (radical hidroxil).

Mecanismul de acţiune al sistemului bactericid dependent de O_2 nu este pe deplin clarificat. Consumul sporit de O_2 este datorat intensificării metabolizării glucozei pe calea şuntului hexozo–monofosfat. Concomitent se intensifică eliberarea intermediarilor reducerii O_2.

Sursa reducătoare pare a fi o oxidază complexă legată de membrana neutrofilului (FAD, quinonă, citocrom b). Oxidaza se reduce, preluând electronii de la o piridin–nucleotidă redusă (NADPH sau NADH) şi se oxidează prin transferul electronilor la molecula de O_2. O_2 este redus în ultimă instanţă la H_2O, dar iniţial are loc o reducere parţială şi se formează astfel un mare număr de intermediari foarte reactivi.

Când O_2 acceptă un singur electron se formează radicalul perhidroxi ($HO_2^•$) sau forma sa ionizată (O_2^-) (anionul superoxid). La pH neutru, radicalul există aproape exclusiv ca anion superoxid. Acesta ($O_2^{-•}$) acţionează fie ca

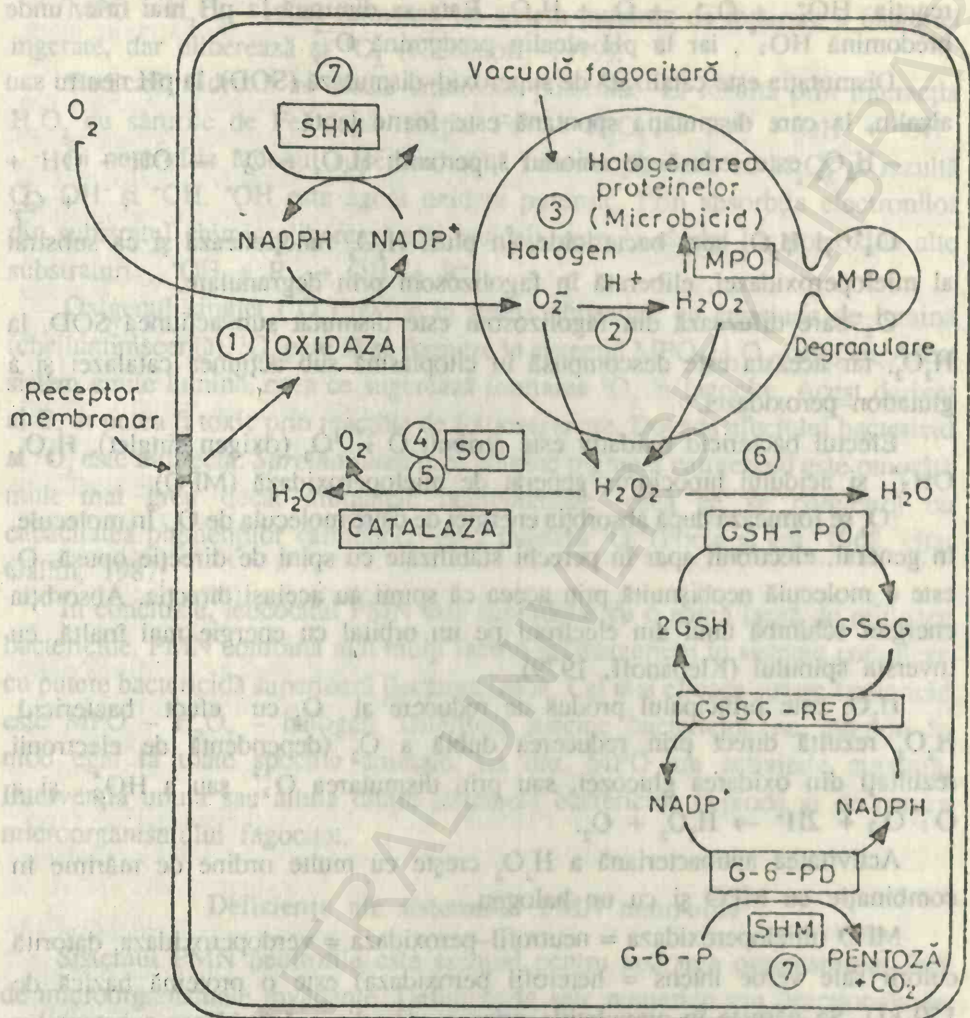


Fig. 73. Reprezentarea schematică a evenimentelor asociate cu efectul bactericid, sub acţiunea mecanismelor dependente de O_2: SHM – shuntul hexozomonofosfaţilor; MPO – mieloperoxidaza; SOD – superoxid dismutază; GSH–PO – glutation peroxidază; GSSG – glutation oxidat; G-6-PD – glucozo-6-fosfat dehidrogenază; G-6-P – glucozo-6-fosfat (după Root, 1981).

reducător, fie ca oxidant. Când acţionează ca reducător al unui substrat, pierde electronul suplimentar şi este convertit la O_2. Când acţionează ca agent oxidant, $O_2^{-\bullet}$ câştigă un electron şi se formează H_2O_2.

Cei 2 radicali ai O_2, $HO_2^{\bullet}$ şi $O_2^{\bullet}$ interacţionează într-o reacţie de dismutaţie, în care unul se reduce iar celălalt se oxidează şi rezultă O_2 şi H_2O_2. Dismutaţia este cea mai rapidă la pH = 4,8, după

reacția: $HO_2^{\bullet} + O_2^{-\bullet} \rightarrow O_2 + H_2O_2$. Rata sa diminuă la pH mai mic, unde predomină $HO_2^{-\bullet}$, iar la pH alcalin predomină $O_2^{-\bullet}$.

Dismutația este catalizată de superoxid–dismutază (SOD), la pH neutru sau alcalin, la care dismutația spontană este foarte lentă.

H_2O_2 este redusă de anionul superoxid: $H_2O_2 + O_2^{\bullet} \rightarrow OH\cdot + OH^- + O_2$.

$O_2^{-\bullet}$ și H_2O_2 sunt bactericide. În plus, H_2O_2 funcționează și ca substrat al mieloperoxidazei, eliberată în fagolizosom prin degranulare.

$O_2^{-\bullet}$ care difuzează din fagolizosom este dismutat sub acțiunea SOD, la H_2O_2, iar aceasta este descompusă în citoplasmă sub acțiunea catalazei și a glutation–peroxidazei.

Efectul bactericid oxidativ este atribuit $O_2^{-\bullet}$, $^1O_2$ (oxigen singlet), H_2O_2, $OH_2^{-\bullet}$ și acidului hipocloros generat de mieloperoxidază (MPO).

$^1O_2$ se formează după absorbția energiei de către molecula de O_2. În molecule, în general, electronii apar în perechi stabilizate cu spini de direcție opusă. O_2 este o moleculă neobișnuită prin aceea că spinii au aceiași direcție. Absorbția energiei schimbă unul din electroni pe un orbital cu energie mai înaltă, cu inversia spinului (Klebanoff, 1979).

H_2O_2 este principalul produs de reducere al O_2 cu efect bactericid. H_2O_2 rezultă direct prin reducerea dublă a O_2 (dependentă de electronii rezultați din oxidarea glucozei, sau prin dismutarea $O_2^{-\bullet}$ sau a $HO_2^{\bullet}$ și a $O_2^{-\bullet}$: $O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

Activitatea antibacteriană a H_2O_2 crește cu multe ordine de mărime în combinație cu MPO și cu un halogen.

MPO (mieloperoxidaza = neutrofil–peroxidaza = verdoperoxidaza, datorită culorii sale verde intens = heterofil peroxidaza) este o proteină bazică de 150 kD. Se găsește în granulațiile primare. Catalizează oxidarea substanțelor donatoare de H^+ sau de electroni, de către H_2O_2.

MPO, alături de H_2O_2 (agent oxidant) și de un halogen (clorul – în exces față de necesarul MPO sau iodul absorbit ca atare ori prin deiodarea hormonului tiroidian) formează un sistem toxic pentru microorganisme diverse: bacterii, fungi, protozoare, viermi, ca și pentru leucocite, eritrocite, plachete, celule tumorale. MPO și H_2O_2 formează un complex cu substratul, cu efect oxidant asupra halogenului și rezultă un compus oxidant: $H_2O_2 + Cl^- \xrightarrow{MPO} H_2O + HOCl$ (acidul hipocloros).

MPO – H_2O_2 – iodul formează un sistem puternic de iodurare a bacteriei ingerate, dar eliberează şi $^1O_2$ (Klebanoff, 1979).

Radicalii hidroxil au efecte citotoxice puternice. Ei rezultă prin interacţia H_2O_2 cu sărurile de Fe, după reacţia: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^\bullet OH$.

În neutrofile anionul superoxid ($O_2^{-\bullet}$) interacţionează cu H_2O_2 şi rezultă O_2, OH^- şi $^\bullet OH$. $^\bullet OH$ este agent oxidant puternic. Prin absorbţia electronilor din substratul chimic eliberează alţi radicali, care la rândul lor pot oxida alte substraturi: $^\bullet OH + R \rightarrow OH^- + R^\bullet$.

Oxigenul singlet ($^1O_2$) revine la starea obişnuită, cu emisiune de lumină (cheiluminiscenţă). $^1O_2$ pare să se formeze în sistemul MPO–H_2O_2–halogen. Acest sistem emite lumină, ceea ce sugerează formarea $^1O_2$ în fagocite. Acest derivat al O_2 ar putea fi toxic prin reacţiile de fotooxigenare. Dovada efectului bactericid al $^1O_2$ este indirectă: *Sarcina lutea* care conţine pigment carotenoid este omorâtă mult mai greu decât mutantele nepigmentate, ceea ce se corelează cu capacitatea pigmenţilor carotenoizi de a inactiva $^1O_2^\bullet$ (Foote şi col, 1968, citat Gallin, 1987.

În concluzie, leucocitul PMN este supradotat cu o gamă largă de mijloace bactericide. PMN combină mai mulţi factori antibacterieni în sisteme complexe cu putere bactericidă superioară fiecăruia izolat. Cel mai eficace sistem bactericid este MPO – H_2O_2 – halogen. Diferitele sisteme bactericide nu intervin în mod egal la toate speciile animale. La om, MPO are activitate maximă. Intervenţia unuia sau altuia dintre sistemele bactericide depinde şi de natura microorganismului fagocitat.

Deficienţe ale sistemului PMN neutrofile

Sistemul PMN neutrofile este esenţial pentru apărarea organismului faţă de microorganismele invadante. Deficienţele sale numerice sau funcţionale se răsfrâng asupra rezistenţei antiinfecţioase. Cele mai cunoscute anomalii ale sistemului PMN neutrofile sunt *neutropeniile* de diferite grade. Când numărul neutrofilelor scade sub 1000 celule/ml, riscul infecţiilor creşte mult, iar în cazul scăderii accentuate (200 neutrofile/ml) dispare posibilitatea unui răspuns inflamator eficient. Neutropenia se datorează fie unei producţii medulare sub nivelul normal, fie unei distrugeri periferice extensive a neutrofilelor.

Deficienţele funcţionale ale neutrofilelor sunt foarte numeroase şi diverse: deficienţe de aderenţă, de chimiotaxie, de fagocitoză, de activitate bactericidă.

Deficienţele de aderenţă se datorează absenţei unor glicoproteine membranare (de 110 şi 180 kD), ceea ce împiedică migrarea lor extravasculară. Pacienţii suferă infecţii bacteriene şi fungice recurente.

Maladia cronică granulomatoasă este lincată pe cromosomul X. Este cea mai cunoscută deficienţă a activităţii bactericide a neutrofilelor. Ingestia este normală, dar omorârea bacteriilor care nu eliberează H_2O_2 (*Staphylococcus aureus*, *Seratia marcescens*) este foarte mult diminuată. Efectul bactericid se menţine asupra bacteriilor care produc H_2O_2 (streptococi, lactobacili). Fagocitele acestor pacienţi au un metabolism oxidativ deficitar, întrucât nu produc H_2O_2. Ingestia nu este însoţită de intensificarea metabolismului oxidativ. În aceste cazuri creşte incidenţa infecţiilor cu bacterii aerobe, catalazo–pozitive, care inactizează H_2O_2 rezultată din propria lor activitate metabolică. Infecţiile cu bacterii, levuri (*Candida*), fungi filamentoşi (*Aspergillus*) sunt trenante şi urmate de reacţii inflamatorii ample, care evoluează în granuloame, ca o reflectare a incapacităţii de a inactiva chemoatractanţii şi de a degrada antigenul. Deficienţa enzimatică esenţială este oxidaza care transferă electronii de la NADPH la O_2 pentru a forma anionul superoxid. Ar putea lipsi chiar donorul de electroni (NADPH) (Forehand, 1986).

Maladia congenitală Chediak–Higashi se caracterizează printr-o activitate fagocitară mult diminuată a macrofagelor şi a PMN: lizosomii lor nu fuzionează cu fagosomii. Din această cauză bolnavii suferă infecţii repetate cu microorganisme facultativ patogene.

Aceste două maladii pun în evidenţă importanţa mecanismelor de fagocitoză în apărarea organismului normal, faţă de infecţiile cu microorganisme puţin virulente.

În concluzie, fagocitoza contribuie decisiv la rezistenţa organismului uman şi animal faţă de agenţii infecţioşi. Aproape 80% din particulele străine din sânge sunt eliminate la primul pasaj al sângelui prin ficat, plămâni şi splină. După ce trece de câteva ori prin aceste organe, sângele se sterilizează.

Acţiunea opsoninelor este foarte importantă pentru stimularea fagocitozei. IgM este cel mai eficient opsonizant faţă de bacteriile Gram negative, iar IgG are o eficienţă de 500–1000 de ori mai mică. Creşterea ratei fagocitozei complexelor imune şi a particulelor acoperite de componente ale complementului (C3b) este consecinţa prezenţei receptorilor pentru Fc şi pentru C3b pe membrana fagocitelor. Fagocitele purtătoare ale acestor receptori au fost denumite „profesioniste", deoarece pot să-şi intensifice în mod specific activitatea, deosebindu-se astfel de fagocitele „amatoare" (celulele reticulare), lipsite de asemenea receptori.

INFLAMAŢIA

Inflamaţia (*inflamare = a arde*) este o reacţie de apărare locală nespecifică. Reacţia inflamatoare este consecutivă unui traumatism tisular, pătrunderii unui corp străin sau unei infecţii. Inflamaţia este procesul prin care leucocitele şi moleculele sângelui sunt eliberate în ariile avariate din organism. Cel mai adesea inflamaţia se produce independent de intervenţia sistemului imunitar.

Suportul anatomic al reacţiei inflamatorii este microcirculaţia: arteriole, capilare, venule şi şunturi arteriovenoase. În reacţia inflamatoare se activează o diversitate de sisteme moleculare şi celulare, care au o activitate vasculară marcată şi determină apariţia principalelor sale manifestări: *eritem, edem, durere, căldură* (rubor, tumor, dolor, calor, descrise de Celsus cu 2000 ani în urmă).

Agresiunea tisulară (produsă pe cale traumatică, de agenţi infecţioşi, prin injectarea unor substanţe, ridicarea temperaturii, radiaţiile) produce *vasodilataţie* (hiperemie) cu creşterea fluxului sanguin spre aria afectată. Datorită alterării celulelor endoteliale se produce creşterea permeabilităţii vasculare în aria respectivă. Alterarea celulelor endoteliale stă la originea aderenţei plachetelor de peretele capilar şi a agregării lor, care declanşază fenomenul coagulării sanguine. Simultan aderă de perete şi leucocitele.

Celulele endoteliale ale capilarelor avariate se contractă şi lasă între ele spaţii libere. Creşte permeabilitatea vasculară a zonei şi componentele plasmei trec în spaţiile extravasculare. Unii mediatori moleculari ai inflamaţiei au capacitatea de a dilata capilarele şi de a contracta venulele, mărind presiunea hidrostatică în venule, favorizând astfel extravazarea componentelor sanguine. Pe măsură ce transudarea progresează, sângele intravascular se concentrează, iar curgerea sa în condiţiile hemodinamice locale (capilare dilatate şi venule contractate) încetineşte, sau încetează în focarele cu avarie severă. Se produce astfel *staza sanguină*. Spre deosebire de tromboză, staza este reversibilă şi durează minute, ore sau chiar zile.

Migrarea leucocitelor din vase, în aria avariată este consecinţa creşterii permeabilităţii capilare. Primele leucocite care migrează în focarul inflamator sunt PMNN. Populaţia totală de neutrofile circulante în sângele periferic este alcătuită din două subpopulaţii: cele care circulă în curentul sanguin *axial* (circa jumătate din numărul PMNN) şi cele care circulă în *zona marginală* a curentului sanguin şi se deplasează încet, la contactul cu endoteliul vascular. În condiţii normale, PMNN aderă foarte rar la endoteliul vascular.

În cazul unei infecţii, celulele tisulare secretă citokine (interleukina 1, TNF). Citokinele stimulează celulele endoteliale capilare, să exprime pe suprafaţa lor,

o categorie specială de molecule denumite *selectine*. Selectinele sunt lectine care mediază contactul selectiv dintre celule.

Molecula de selectină are 3 domenii: un domeniu intramembranar (cu rol de legare), un domeniu extracelular şi un al treilea situat la extremitatea liberă a moleculei, cu rolul de lectină. Funcţia sa este mediată de prezenţa ionilor de Ca.

Moleculele de selectină se exprimă pe suprafaţa internă a celulelor endoteliului capilar, ori de câte ori ţesutul este supus unei agresiuni. Leucocitele marginale aderă de moleculele de selectină ale endoteliului capilar. Se intensifică marginaţia celor care circulă în curentul sanguin axial. După aderenţă, PMNN îşi extind pseudopodele la joncţiunea dintre celulele endoteliale ale capilarului şi se deplasează în acest spaţiu, prin mişcare amoeboidă. Ulterior penetrează membrana bazală a capilarului şi pătrund în ţesut. Procesul migrării din lumenul vascular se numeşte *diapedeză* şi este facilitat de secreţia proteazelor neutre (elastază, colagenază).

Interacţiunea selectină – PMNN este specifică. Selectinele mediază aderenţa şi transferul extravascular al leucocitelor, cu caracter adaptativ. Celulele endoteliale au o rezervă internă de selectină P, pe care o mobilizează şi o expun la suprafaţă, în câteva minute, pentru mobilizarea rapidă a leucocitelor. Aceleaşi celule, la nevoie sintetizează şi expun selectina E.

Odată ajunse în spaţiul extravascular, deplasarea leucocitelor spre celulele avariate, spre agentul iritant sau patogen este controlată de factori chimiotactici. În focarul inflamator, leucocitele eliberează produse metabolice sau se lizează şi eliberează enzime şi mediatori. Aceştia, alături de factorii de coagulare şi de componentele complementului amplifică procesul inflamator.

Pe lângă PMNN, la locul inflamaţiei vin monocite, limfocite şi chiar eritrocite. Monocitele provin din mai multe surse. *Monocitul circulant* intră în ţesuturi fie pentru a deveni macrofag rezident tisular, fie ca răspuns la stimulii chimiotactici. Majoritatea mononuclearelor dintr-un focar inflamator provin din monocitele circulante, cu originea în măduva oaselor. A II-a sursă de monocite sunt cele rezultate prin procesul *diviziunii celulare*. A III-a sursă sunt mononuclearele *rezidente* în ţesuturi, cu viaţă lungă, care se activează şi se deplasează în focarul de inflamaţie. Acestea se găsesc în special, în granuloamele inflamatoare cronice.

Tipul celular dominant în focarul de inflamaţie variază mult, după natura stimulului antigenic şi după tipul de reacţie inflamatoare pe care o declanşază: *acută* sau *cronică*.

Reacţiile inflamatorii *acute* se derulează într-o perioadă scurtă de timp, deoarece forţele de apărare ale organismului neutralizează agentul invadant şi curăţă rapid locul inflamaţiei. Focarele inflamatorii acute conţin în special

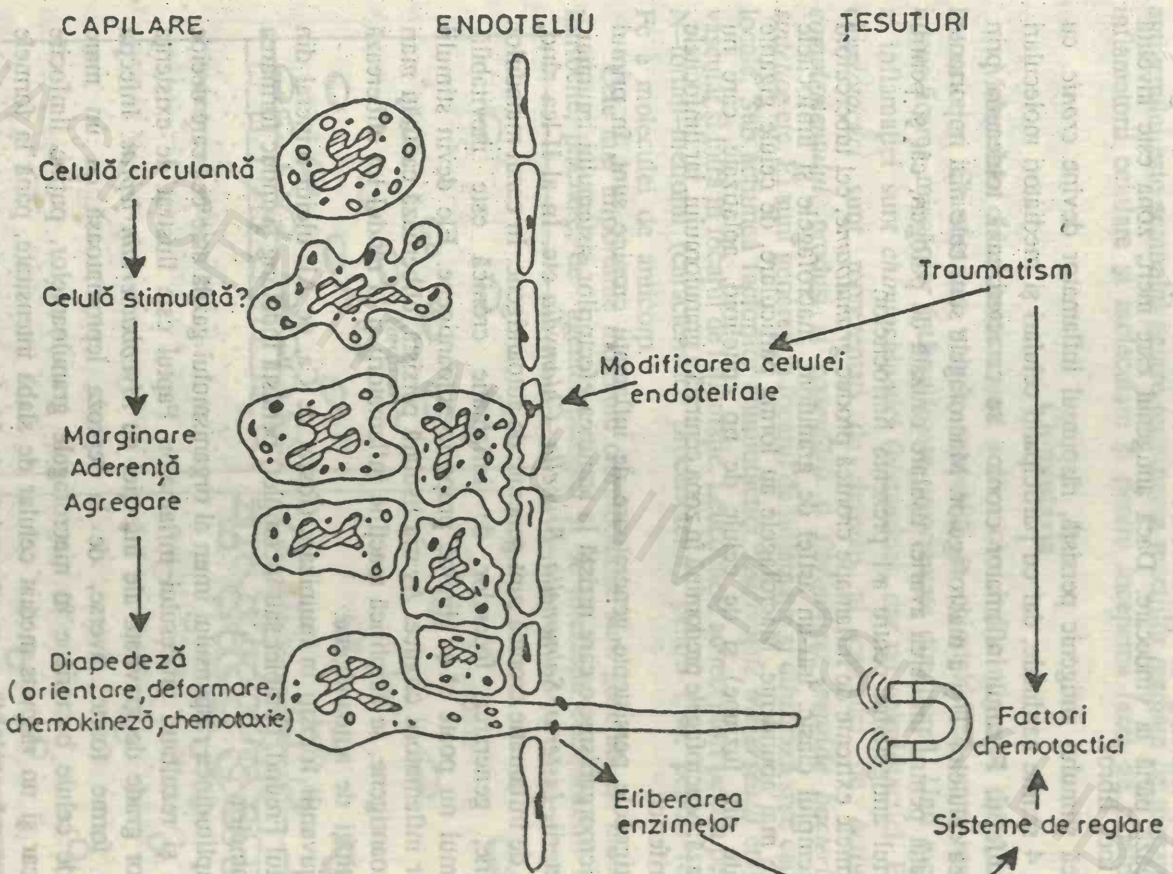


Fig. 74. Reprezentarea schematică a fenomenelor implicate în atragerea leucocitelor PMN în focarele inflamatorii (după Gallin, 1980).

PMNN şi sunt delimitate de celule fagocitare şi fibrină. Focarul are o cavitate centrală plină cu PMNN vii şi moarte, celule invadante şi resturi celulare. Centrul focarului este purulent, microorganismul este eliminat şi regenerarea tisulară (cicatrizarea) marcată de proliferarea fibroblastelor şi sinteza colagenului progresează până la vindecare. Dacă antigenul este inert, zona este învelită într-un inel fibros.

Dacă stimulul antigenic persistă, răspunsul inflamator devine *cronic*, cu aceleaşi 4 semne cardinale, dar cu participanţi celulari şi mediatori moleculari parţial diferiţi. Focarul inflamator cronic se caracterizează totdeauna prin infiltrarea celulelor T şi a macrofagelor. Macrofagele sunt cele mai importante celule, atât pentru limitarea avariei tisulare cauzată de patogen, cât şi pentru transportul antigenului pentru a-l prezenta limfocitelor.

Formele extreme de inflamaţie cronică produc *granuloame*, cel tuberculoid fiind exemplul clasic. Într-un astfel de granulom, macrofagele şi limfocitele sunt cele mai abundente. Macrofagele au forme particulare, de celule gigante (provenite din fuziune) şi de celule de tip epitelioid, aplatizate, care nu fagocitează. Macrofagele predomină în zona centrală a granulomului, iar limfocitele sunt periferice.

Antigenele persistente generatoare de inflamaţii cronice sunt, în primul rând, microorganismele care rezistă la acţiunea efectorilor sistemului imunitar: micobacterii, *Listeria*, *Salmonella*, *Brucella*, *Chlamydia* etc. În al II-lea rând, focarele de inflamaţie cronică sunt generate de autoantigene. În cazul maladiilor autoimune, generarea focarelor de inflamaţie cronică este inevitabilă. Organismul nu poate să-şi elimine propriile autoantigene. Ele devin stimulii reacţiilor inflamatorii cronice. Avaria tisulară persistă, eliberează cantităţi mari de autoantigene, se amplifică reacţiile inflamatorii şi la rândul lor eliberează noi cantităţi de autoantigene.

Adjuvanţii folosiţi în imunizare (fosfat de Ca, de Al, uleiul mineral din adjuvantul Freund, complet sau incomplet) persistă îndelung şi induc formarea granuloamelor.

Amplitudinea răspunsului imun al organismului gazdă este cea care decide evoluţia şi rezultatul procesului inflamator. Faptul este ilustrat de existenţa diferitelor grade de gravitate ale infecţiei cu *Mycobacterium leprae*. Infecţia prezintă forme foarte diverse, de la leproza lepromatoasă cu un mare număr de celule bacteriene în macrofagele granuloamelor, puţine limfocite T în focar şi un răspuns mediat celular de slabă intensitate, până la formele de lepră tuberculoidă, cu puţine celule de *M. leprae* şi răspuns imun mediat celular, intens.

În concluzie, reactivitatea imună a organismului, dar şi natura antigenului condiţionează evoluţia procesului inflamator. Antigenul este iniţiatorul răspunsului inflamator, iar forţele de apărare modulează acest răspuns. Îndepărtarea antigenului este semnalul pentru terminarea reacţiilor mediate de mecanismele inflamatorii celulare şi moleculare şi pentru începerea fazei de cicatrizare.

Chimiotaxia

Moleculele chimiotactice sunt acelea care induc migrarea direcţională a leucocitelor. Chimiotaxia trebuie deosebită de chimiokineză, care semnifică intensificarea mişcărilor întâmplătoare, neorientate direcţional. Unii mediatori ai inflamaţiei sunt *chimiochinetici* (histamina), dar nu chimiotactici. Factorii *chimiotactici* sunt reprezentaţi de derivaţi ai cascadei de *activare a complementului*, produşi ai *coagulării* şi *fibrinolizei*, *peptide bacteriene* şi *sintetice* etc. Ei sunt generaţi în focarul de inflamaţie şi difuzează spre capilarele locale. Sub acţiunea factorilor chimiotactici, *leucocitele traversează* endoteliul vascular şi intră în focarul de inflamaţie. Leucocitele au receptori pentru peptidele N-formil-metionil (caracteristice procariotelor), pentru C3b, pentru regiunea Fc a moleculei de anticorp.

Cele mai importante molecule chimiotactice sunt generate de macrofage, limfocite, plachete, de agentul patogen şi de interacţia complexelor Ag-Ac

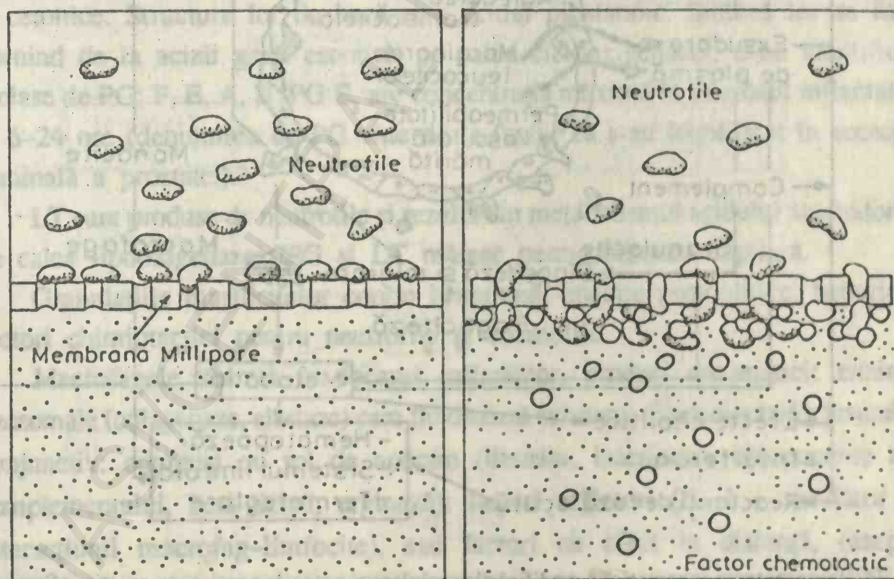


Fig. 75. Reprezentarea schematică a tehnicii de evidenţiere a prezenţei unui factor chimiotactic (după Dias da Silva, 1986).

cu complementul. Primul factor *chimiotactic* identificat este *C5a*, eliberat din cascada de activare a complementului, sub acţiunea hidrolazelor tisulare sau a proteazelor bacteriene. C5a este atractant pentru neutrofile şi macrofage.

Monocitele, macrofagele şi neutrofilele sunt atrase de concentraţii mici (1 nM) de *peptide formil–metionil* eliberate de bacterii. Catena peptidică a procariotelor este iniţiată cu un rest formil–metionil.

Neutrofilele din focarul inflamator produc leucotriena B4. Monocitele, neutrofilele, eozinofilele au receptori pentru leucotriena B4, astfel încât primele neutrofile care ajung în focarul inflamator induc imigraţia altora. Neutrofilia iniţială induce neutrofilie. Mediatorii chimiotactici nu-şi blochează reciproc receptorii.

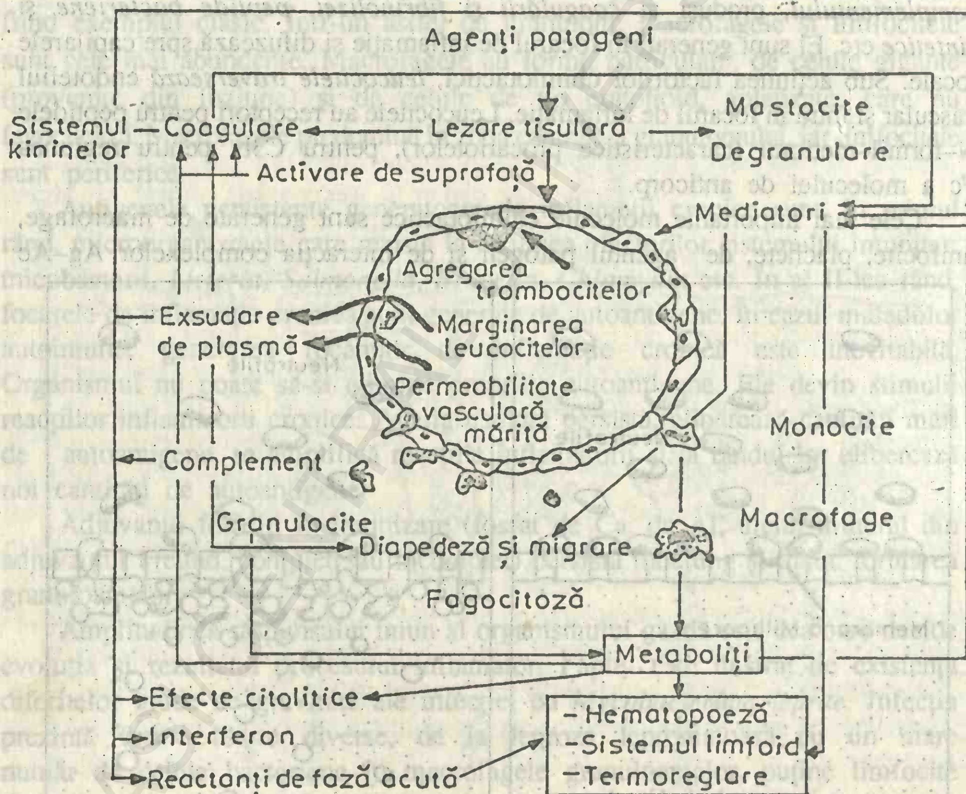


Fig. 76. Reprezentarea schematică a modificărilor celulare şi umorale asociate cu reacţia inflamatorie (după Fauve, 1970).

Pe lângă stimulii chimiotactici, în focarul inflamator se eliberează şi alţi factori, cu aceiaşi origine (în cascada de fixare a complementului, în limfocite, granulocite, mastocite, plachete) care determină manifestările reacţiei inflamatorii: alterarea fluxului sanguin şi a permeabilităţii capilare. Acţiunea lor afectează vasele locale mici, dar nu se limitează la leucocite, ci implică întregul ţesut ca suport al inflamaţiei: C3a şi C5a determină contracţia muşchilor netezi (pentru că mimează reacţia anafilactică se numesc *anafilatoxine*). Ambele induc degranularea mastocitelor, cu eliberarea histaminei şi efectul este spasmogen. Mastocitele sunt celule din ţesutul conjunctiv, aşezate lângă vasele sanguine. Ele sunt activate fie direct de moleculele IgE, fie indirect de către C3a şi C5a.

După activare, în mastocite se produce un influx de Ca^{2+} şi creşterea nivelului AMPc. Are loc degranularea şi simultan se eliberează o fosfolipază care scindează acidul arachidonic din fosfolipidele membranare. Acidul arachidonic este convertit în compuşi eicosanoidici (cu 20 atomi de C): prostaglandine (PG) şi leucotriene (LT).

PG sunt acizi graşi nesaturaţi, cu 20 atomi de C, care conţin grupări OH^- şi cetonice. Structura lor de bază este acidul prostanoic. Sinteza lor se face pornind de la acizii graşi esenţiali pe calea ciclooxigenazei. S-au identificat 4 clase de PG: F, E, A, B. PG E_2 are concentraţia maximă în exudatul inflamator la 6–24 ore (denumirea de PG vine de la faptul că s-au identificat în secreţia seminală a prostatei).*

LT sunt produse de neutrofile şi rezultă din metabolismul acidului arachidonic pe calea lipooxigenazei. PG şi LT măresc permeabilitatea capilară.

Granulaţiile mastocitelor conţin histamină, enzime proteolitice, heparină, factori chimiotactici pentru neutrofile şi eozinofile.

Macrofagele secretă în focarul inflamator, produşi enzimatici: enzime lizosomale (colagenaze, elastaze) care fluidizează substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv; compuşi cu rol de apărare (lizozim, interferon, componente ale complementului, beta–lizină, arginază); factori reglatori (IL–1 – mediator al interacţiunii macrofag–limfocite), sau factori cu efect la distanţă, (asupra măduvei osoase), stimulând producţia de neutrofile şi asupra S N C (mediatori ai reacţiei febrile).

Beta-lizina este o proteină cationică, termostabilă (g m = 6000 D). Se găseşte în plachete şi în umorile organismului. Omoară celulele bacteriene în câteva minute.

Arginaza este sintetizată şi eliberată de macrofagele activate. Are efect litic asupra unor celule maligne.

Lactoferina este produsă şi eliberată de PMN. Are proprietatea de a lega Fe. Dacă nu este complet saturată cu Fe inhibă creşterea bacteriilor deoarece leagă Fe necesar, ca un element esenţial creşterii celulelor bacteriene.

Reactanţii de fază acută sunt proteine serice a căror concentraţie în sânge creşte în timpul şi după procesul inflamator. Cele mai tipice proteine *de fază acută* sunt alfa 1-glicoproteina acidă (AGA) şi proteina C reactivă (CRP).

AGA, alături de alfa 1- antitripsină, haptoglobină şi cerulopasmină face parte din cel de al II-lea set al reactanţilor de fază acută, a căror concentraţie creşte la 12–24 ore de la declanşarea procesului inflamator, fiind unul din indicatorii esenţiali pentru diagnosticul şi monitorizarea infecţiilor.

Rolul proteinei C reactive în apărarea humorală nespecifică a fost prezentat anterior.

În ciuda diversităţii factorilor moleculari care participă la răspunsul inflamator, activitatea biologică esenţială ce se desfăşoară într-un focar inflamator acut este *fagocitoza*. De fapt, o bună parte a moleculelor din focarul inflamator prin efectul lor opsonizant înlesnesc fagocitoza.

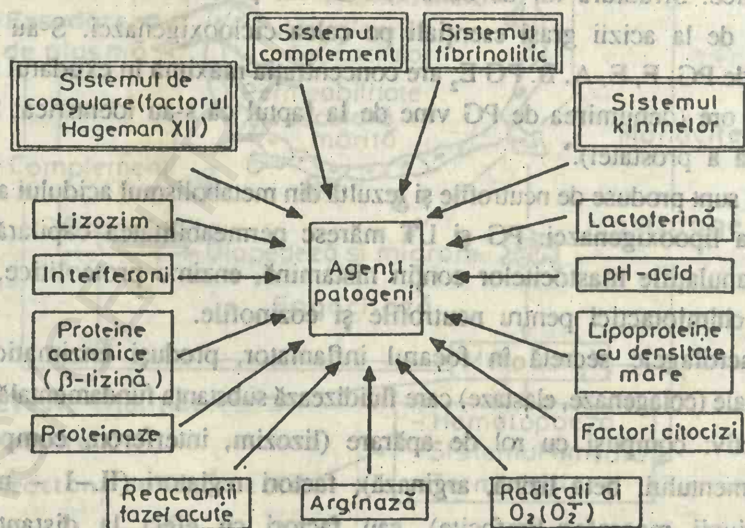


Fig. 77. Reprezentarea schematică a diferitelor sisteme enzimatice (în casete cu contur dublu) şi produşi secundari ai inflamaţiei, implicaţi în apărarea organismelor faţă de agenţii patogeni (după Fauve, 1980).

Uneori însă, agenţii patogeni invadatori sau celulele maligne elimină factori chimiotactic negativi pentru celulele din focarul inflamator, sau *imunorepelenţi*. Existenţa lor s-a demonstrat cel puţin în supernatantul unor celule maligne. Sunt molecule cu g m între 1000–12000 D. După injectarea lor la şoarece şi cobai, reduc influxul PMN şi al macrofagelor, reduc rezistenţa la infecţia cu *L. monocytogenes*. Bacteriile şi paraziţii elimină factori repelenţi pentru efectorii reacţiei de apărare a gazdei. Bacteriile virulente (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. pertusis*) diminuă reacţia inflamatorie la locul inoculării şi împiedică funcţia celulelor fagocitare. Capacitatea de a inhiba concentrarea efectorilor celulari la locul agresiunii este unul dintre cele mai vechi mecanisme de virulenţă.

În concluzie, reacţiile inflamatorii sunt benefice pentru organismul gazdă. Ele reprezintă un mecanism nespecific de limitare a infecţiei şi de curăţire a resturilor celulare rezultate din avarie. De aceea se afirmă că mecanismele reacţiei inflamatorii sunt active nu numai în vindecarea leziunilor tisulare, ci şi în reacţiile de apărare locală faţă de microorganismele infecţioase, constituind un mecanism esenţial de apărare a integrităţii organismului.

Uneori, rezultatul reacţiei inflamatorii este necroza tisulară (fenomenul Arthus).

Capitolul VIII

SISTEMUL COMPLEMENT

Sistemul complement este un set de proteine şi glicoproteine plasmatice care reprezintă circa 10% din globulinele serului normal, uman şi al vertebratelor, cu rol esenţial în apărarea organismului. Majoritatea componentelor sale sunt proteine cu acţiune enzimatică (proteaze). Ele nu sunt imunoglobuline şi concentraţia lor plasmatică nu este modificată de imunizare.

Proteinele complementului (C) se găsesc la toate vertebratele. Ele acţionează nespecific şi completează efectele imunologice specifice ale anticorpilor. Unele componente sunt proteine de *fază acută*, adică se sintetizează rapid şi concentraţia lor serică creşte în timpul răspunsului inflamator acut. Efectele C constau în *opsonizarea* celulelor bacteriene (favorizarea fagocitozei) şi în avaria membranei celulelor purtătoare de antigene, uneori provocând *liza*.

Acţiunea sistemului C a fost evidenţiată în 1884 de Grohmann, iar ulterior, de Nuttall şi Buchner. Ei au arătat că serul are efecte litice asupra unor bacterii *in vitro*. Activitatea litică dispare după încălzirea serului la 56°, timp de 30 min. Factorul care mediază liza bacteriană este termolabil, şi Buchner l-a denumit *alexină* (allexein = a distruge). În 1890, *Behring* şi *Nissen* au realizat un experiment devenit clasic: serul proaspăt de la cobaiul imunizat a lizat celulele de *Vibrio metchnikovi*, dar serul de la cobaiul neimunizat nu a avut această proprietate. Aşadar, factorul litic (alexina) acţionează în strânsă cooperare cu anticorpii.

Pfeiffer (1894) studia reacţiile imunologice la cobai, după infecţia cu *Vibrio cholerae*, în diferite variante experimentale. La cobaii imunizaţi cu celule omorâte de *V. cholerae*, după inocularea vibrionilor virulenţi în cavitatea peritoneală, a remarcat dispariţia lor rapidă, iar la cei neimunizaţi, inocularea este urmată de infecţia mortală. Fenomenul lizei vibrionilor a fost reprodus *in vitro*, prin

punerea în contact a serului imun de cobai, cu celule de *V. cholerae*. Încălzirea la 56° (30 min) a serului imun anulează efectul său litic *in vitro*, dar proprietatea este restabilită prin adăugarea serului proaspăt neimun. Activitatea litică a serului imun este rezultatul acţiunii cooperante a anticorpilor şi a unui factor termolabil nespecific.

Se cunosc 11 proteine ale căii clasice, 3 proteine suplimentare ale căii alterne şi 6 proteine cu efect reglator (inhibitorii). Componentele căii clasice sunt enumerate în ordinea descoperirii lor. Unele componente ale căii alterne sunt notate cu litere mari: B, P, D. Fragmentele peptidice derivate din proteoliză sunt notate cu sufixele *a, b* etc. (de exemplu, C3a, C3b). Fragmentele *b* sunt mai mari, se combină direct cu o ţintă membranară, iar fragmentele *a* sunt mai mici, se eliberează în soluţie şi favorizează răspunsul inflamator. Starea activată enzimatic a factorilor C se notează cu o bară: de exemplu $\overline{C1_1}$.

MECANISMUL GENERAL DE ACTIVARE A SISTEMULUI COMPLEMENT

Proteinele componente ale C se activează în două cascade enzimatice legate între ele, denumite calea *clasică* şi calea *alternă*. Cele două căi se intersectează într-un punct, *clivajul lui C3*, eveniment cheie al activării sistemului C.

Fiecare componentă activată este o protează înalt specializată, care la rândul ei clivează un fragment peptidic al precursorului plasmatic. Consecutiv clivării rezultă un fragment principal, al cărui situs de legare la membrană este astfel expus. Fragmentul se leagă pe membrană şi la rândul său devine enzima activă următoare a secvenţei de reacţie. Cascada de fixare a C se amplifică în fiecare etapă, deoarece fiecare enzimă poate activa numeroase molecule ale reacţiei următoare a secvenţei. Ca mecanism general, de acţiune, activarea sistemului C este analoagă coagulării şi fibrinolizei. Principala diferenţă constă în faptul că sistemul C este legat de *membrane* sau de *complexe imune* şi în condiţii fiziologice acţionează local.

Proteinele căii clasice sunt numerotate cu cifre arabe de la 1 la 9 şi se activează în secvenţa 1, 4, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9. Majoritatea lor sunt beta-globuline (beta 1, beta 2). Proteinele C sunt alcătuite din 1–2 lanţuri peptidice, reunite prin punţi S–S, cu excepţia lui C4 care are 3 lanţuri peptidice, iar Clq are o structură particulară, unică.

În calea clasică, complexul proteic Cl se leagă de complexele antigen–anticorp şi devine o protează activă, ce clivează şi activează C4 şi C2. Se formează o enzimă complexă – *C3 convertaza*, care scindează specific C3.

Calea alternativă nu necesită prezența anticorpilor pentru activare. Unele substanțe, mai ales cele din peretele bacterian și fungic, învelișul unor paraziți, peplosul viral, activează un alt set de proteine serice, care la rândul lor clivează C3.

Stadiile finale sunt comune pentru ambele căi.

CALEA CLASICĂ DE ACTIVARE A COMPLEMENTULUI

Calea clasică de activare a sistemului C este inițiată de complexele Ag–Ac, care conțin o moleculă de IgM sau cel puțin două molecule de IgG (subclasele IgG_1 și IgG_3). IgA și IgE nu leagă C. Necesarul pentru două molecule de IgG, implică faptul că epitopii trebuie să fie foarte apropiați. Dacă epitopii sunt prea îndepărtați, C nu va fi activat, indiferent de numărul moleculelor de IgG legate.

Secvența de evenimente ale acestei căi cuprinde următoarele etape: a) *recunoașterea;* b) *activarea enzimatică*; c) *atacul membranar*.

Unitatea de *recunoaștere* a sistemului C este complexul Cl, un agregat format din 3 proteine: Clq, Clr și Cls, asociate lax, necovalent, într-un complex cu Ca^{2+}. Clq este o proteină de 400 kD, formată din 18 lanțuri peptidice, reunite în 3 subunități de câte 6 lanțuri fiecare. Fiecare subunitate este formată din două helice triple, în formă de Y, reunite la un capăt printr-o structură în formă de tijă, iar la capătul opus se termină printr-o conformație globulară, nehelicală.

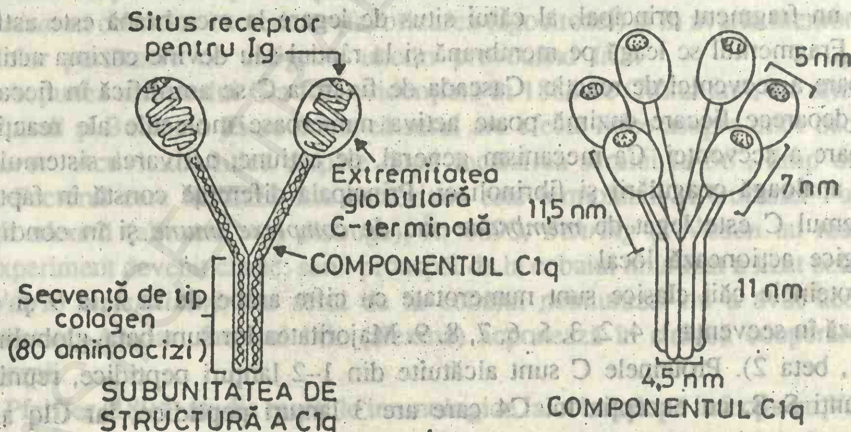


Fig. 78. Structura componentului Clq. Cele 18 catene peptidice sunt reunite în 3 subunități, fiecare formată din 6 catene. Fiecare subunitate este formată din două helixuri triple, reunite în Y la o extremitate și se termină cu un „cap" globulos, la nivelul căruia sunt situați receptorii pentru legarea de segmentul Fc al imunoglobulinelor (după Roitt și colab., 1985).

Primii 80 aminoacizi care compun helicea fiecărui lanț triplu helix, conțin numeroase secvențe de tipul gly–x–y (prolină, izoleucină, hidroxilizină), foarte asemănătoare cu a fibrelor de colagen. La nivelul extremității globuloase se găsesc situsurile de legare cu molecula de imunoglobulină.

Faptul că legarea lui Clq necesită minimum două molecule de IgG implică obligativitatea ca determinanții antigenici să aibă o anumită densitate, pentru a permite apropierea suficientă a două molecule de IgG, care vor activa Clq. Legarea moleculelor de imunoglobulină în complexul imun, induce modificări conformaționale ale regiunii Fc, care va expune situsul de legare al lui Clq. Cantitatea Clq fixată crește în funcție de pătratul numărului de molecule de IgG și este proporțională cu concentrația IgM.

Clq nu are activitate proteazică. În prezența Ca^{2+}, Clq este asociat cu două catene Clr și două catene Cls. Mecanismul de activare al lui Clr și Cls nu este cunoscut. Ele sunt foarte asemănătoare (83 kD fiecare) și în treapta de clivare–activare, din fiecare rezultă două fragmente: ușor (27 kD) și greu (56 kD). Fragmentul ușor Clr are activitate serin–proteazică. Substratul acțiunii sale pare a fi Cls. Fragmentul mic rezultat din clivarea lui Cls interacționează cu următoarele două proteine ale C (C4 și C2), pe care le clivează.

Studiul căii clasice de activare a C s-a realizat pe complexul eritrocit-anticorp (EA). Activarea lui Cl se face după următoarea reacție globală: EA + Cl + Ca^{2+} $\rightarrow$ EACl (EAClqrs).

Sistemul de activare enzimatică. Cls are activitate esterazică și clivează componenta C4. C4 este alcătuit din 3 catene peptidice, legate prin punți S–S, notate alfa, beta și gama. Cls activat clivează un fragment mic N-terminal, de 9 kD(C4a), din lanțul alfa. Restul moleculei, C4b, relevă o punte tioester internă pe lanțul alfa și formează o legătură covalentă cu grupările NH_2 sau –OH ale multor proteine. Clivarea are loc în plasmă. Mai puțin de 10% din moleculele de C4b se leagă de suportul activator, fie la complexul $\overline{\text{Clqrs}}$, fie pe membrană într-un situs adiacent. Reacția globală este: EACl + C4 $\rightarrow$ EACl4b + C4a.

În prezența ionilor de Mg^{2+}, C4b din complexul EACl4b leagă C2, pe care îl clivează în două fragmente. Cel mai mare, C2b (70 kD), rămâne legat pe C4b și formează complexul $\overline{\text{C4b2b}}$, denumit *convertaza C3*. C2b din complexul EACl4b2b este relativ instabil (T 1/2 = 10 min la 37°) și se disociază ca fragment inactiv, dar restul complexului (EACl4b) leagă și clivează altă moleculă de C2 și reface EACl4b2b); EACl 4b + C2 $\rightarrow$ EACl4b2b + C2a.

Clivarea lui C3 în calea clasică. $\overline{C4b2b}$ (C3 convertaza) dintr-un situs membranar adiacent sau din complexul $\overline{Clqrs4b2b}$ acţionează asupra lui C3: $\overline{Clqrs4b2b}$ + C3 → $\overline{Clqrs4b2b3b}$ + C3a.

C3-convertaza ($\overline{C4b2b}$) detaşează un peptid de 9 kD de la extremitatea N-terminală a lui C3 şi relevă un situs de legătură tisoestrică pe fragmentul mare C3b. Peptidul de 9kD este *anafilatoxina* C3a, iar C3b este principala *opsonină termolabilă* a serului. Fiecare unitate $\overline{Clqrs4b2b}$ clivează sute de molecule de C3, datorită concentraţiei sale plasmatice foarte ridicate. Majoritatea moleculelor de C3b rămân în plasmă şi au rol *opsonizant*. Receptorii pentru C3b se găsesc pe toate celulele fagocitare (neutrofile, monocite, macrofage, eozinofile), dar şi nefagocitare (eritrocite, epiteliul glomerulului renal).

Moleculele opsonizante de C3b, prin situsul tioesteric se leagă la grupările-OH sau $-NH_2$ din membrana celulară, ori ale lanţului H al imunoglobulinei din complexele Ag–Ac.

Unele molecule de C3b se leagă la complexul C4b2b, la situsul membranar şi formează următoarea unitate catalitică, $\overline{C4b2b3b}$ (C5 convertaza), *care clivează C5*.

C3b clivează C5 într-un peptid de 15 kD, C5a (din lanţul alfa C5), iar restul este C5b. Ultimul se fixează pe membrana suport activatoare şi iniţiază formarea *complexului de atac membranar*. C5b liber este instabil şi se agregă. Stabilitatea este conferită de complexarea cu C6. Reacţiile următoare ale căii implică formarea complexelor progresiv mai mari, fără ruperea legăturilor peptidice. Complexul $\overline{C5b6}$ este *hidrofil*. În prezenţa lui C7 rezultă complexul $\overline{C5b67}$, cu proprietăţi amfifile: este *hidrofob* pentru că expune grupări apolare (nu formează legături de H cu moleculele de apă), prin care se leagă de fosfolipide şi concomitent este hidrofil. Existenţa simultană a grupărilor hidrofobe şi hidrofile în acelaşi complex poate explica tendinţa sa de polimerizare. În stare liberă, în soluţie, $\overline{C5b67}$ este instabil (timp de înjumătăţire de 0,1 s). Devine stabil prin inserţia în dublul strat lipidic membranar şi are proprietăţi detergente.

La complexul $\overline{C5b67}$ se polimerizează C8 şi C9 şi rezultă un complex macromolecular ($\overline{C5b6789}$) de formă cilindrică, evidenţiat la microscopul electronic, în membrana hematiilor. Complexul are o suprafaţă externă hidrofobă, un miez central hidrofil şi reprezintă *complexul de atac membranar*. Esenţiale pentru distrugerea celulei sunt moleculele de C9. Circa 18 astfel de molecule se leagă la un situs şi formează canale transmembranare prin polimerizare. Aceste canale penetrează pe direcţie perpendiculară, stratul lipidic al membranei şi permit

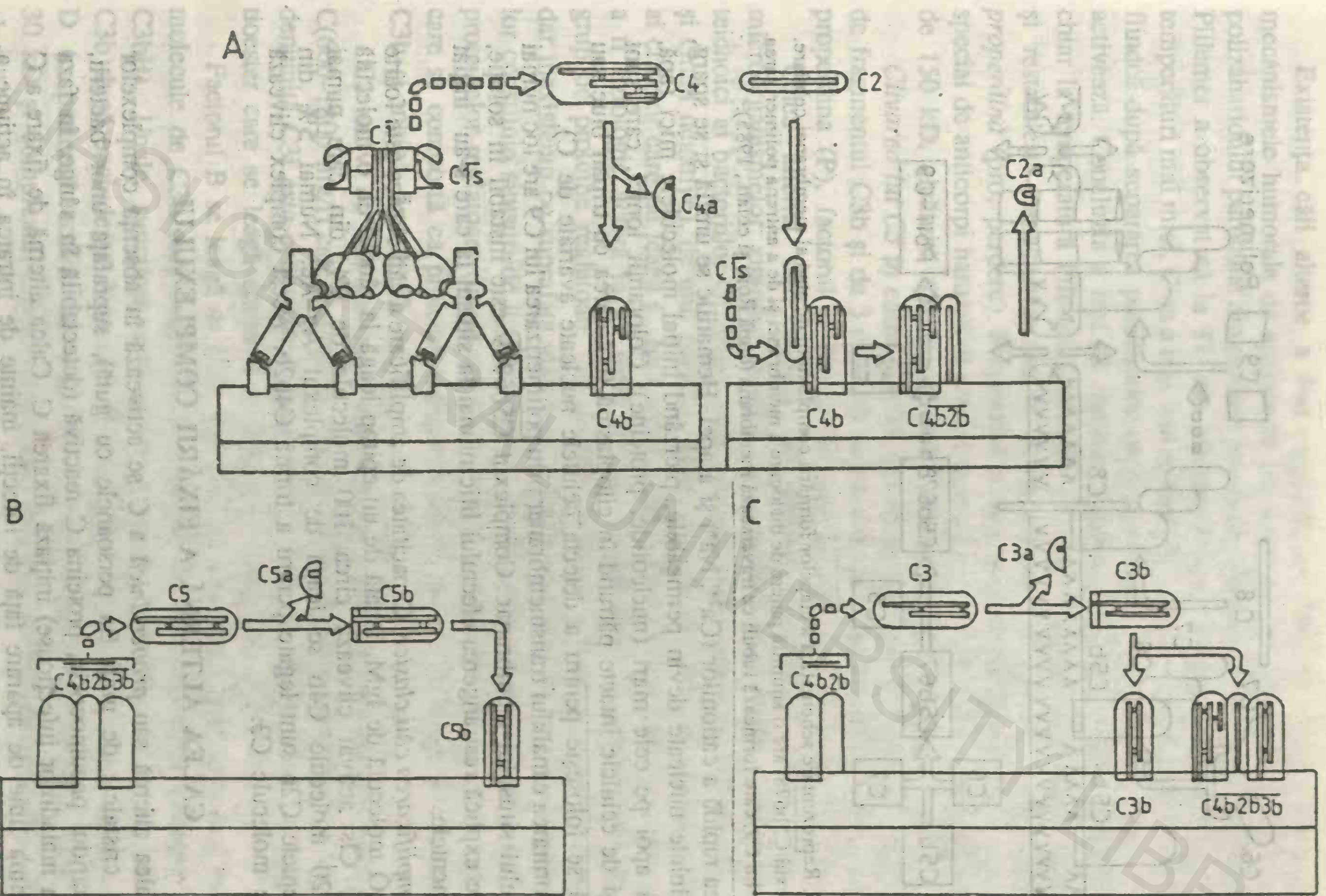


Fig. 79. A. Formarea C4b2b (convertaza lui C3 pe calea clasică). C1s clivează C4 şi eliberează fragmentul C4a. C4b se leagă de membrana adiacentă. C2 din ser se asociază cu C4b şi este clivar de C1s. Se eliberează C2a şi se formează C4b2b.

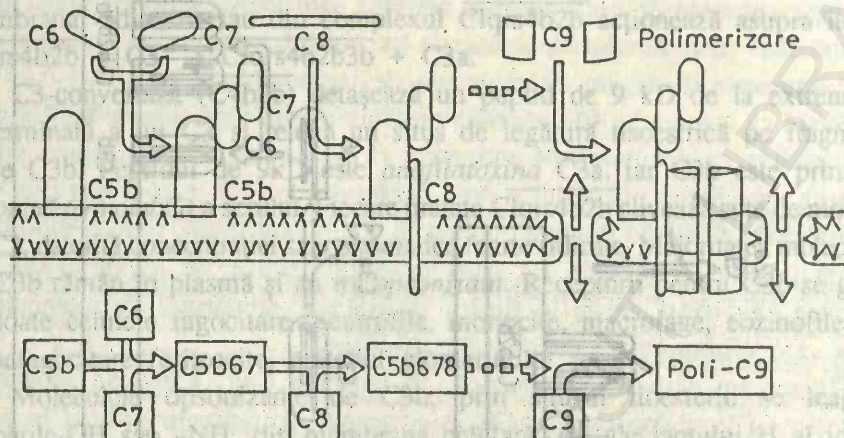


Fig. 80. Reprezentare schematică a etapelor formării complexului de atac al membranei celulare. Complexul C5b678 are o anumită putere de dislocare a membranei şi de a antrena polimerizarea lui C9, care formează tubuli ce traversează membrana (după Roitt şi colab., 1985).

intrarea rapidă a cationilor (Ca^{2+}, Na^{+}) şi a apei. Hematiile se umflă şi se sparg, iar celulele nucleate devin permeabile, pierzând iniţial moleculele mici (apă, K^{+}) şi apoi pe cele mari (nucleotide, proteine). Coloranţii ionici, care sunt excluşi de celulele intacte pătrund în citoplasmă (colorarea cu tripan blue sau eozină se foloseşte pentru a detecta celulele nucleate avariate de C).

Formarea canalului transmembranar prin polimerizarea lui C9 are loc numai la nivelul situsului membranar. Complexul C5b6789 este instabil în soluţie, ceea ce explică restrângerea efectului litic numai la situsul la care s-au iniţiat evenimentele.

Amplificarea căii clasice. Capacitatea de amplificare a căii clasice este foarte mare. O moleculă de IgM, legată de un epitop leagă la rândul ei, o moleculă de Cl. Cls activat clivează circa 100 molecule de C4, din care numai circa 20 molecule C4b se leagă de complexul Ag–Ac. Numai 5% din fragmentele C2b sunt legate pentru a forma C4b2b. Acest complex clivează mii de molecule C3.

CALEA ALTERNĂ A FIXĂRII COMPLEXULUI

Calea alternă sau *properdinică* a C se activează în absenţa complexelor imune: cristalele de uraţi (la persoanele cu gută), suprafaţa unor bacterii, polizaharidul pneumococic, proteina C reactivă (detectabilă în sânge, în faza acută a maladiilor infecţioase) iniţiază fixarea C. Calea alternă de fixare a C este prima linie de apărare faţă de infecţii, înainte de intrarea în acţiune a sistemului imunitar.

Existența căii alterne a fost sugerată de Pillemer (1954), care studia mecanismele humorale de apărare la organismele neimunizate. Prin incubarea polizaharidului particulat din peretele levurilor, denumit *zimosan*, cu serul normal, Pillemer a observat că la 37° are loc activarea C și epuizarea sa din ser. La temperaturi mai mici, C nu a mai fost activat, dar serul își modifică proprietățile, fiindcă după separarea particulelor de zimosan prin centrifugare, C nu se mai activează. Concluzia a fost că zimosanul interacționează cu un factor din ser, chiar la temperatură inferioară activării C, care se poate elua de pe particule și restabilește capacitatea serului de a activa C. Factorul a fost denumit *properdină* (pro, perdere). Properdina a fost considerată mult timp ca un tip special de anticorpi naturali ai serului normal, cu un titru mic. Este o globulină de 150 kD, alcătuită din 3 subunități identice și are mobilitate gama.

Clivarea lui C3 în calea alternă. Secvența alternativă a activării C depinde de fragmentul C3b și de 3 proteine serice care nu participă la secvența clasică: properdina (P), factorul B (B) și factorul D (D). Este necesar Mg^{2+}.

Calea alternă este inițiată de diferite polizaharide (mai ales ale microorganismelor: zimosan, inulină, LPS ale bacteriilor Gram negative, acizii teichoici ai bacteriilor Gram pozitive), de suprafața bacteriilor (Gram pozitive și Gram negative), de unii paraziți, de moleculele agregate de anticorpi (chiar ai claselor care nu leagă C, IgG_4 agregat, IgA, fragmentele $(Fab)'_2$). Calea pare a fi fiziologic activă la un nivel scăzut. Amplificarea ei este stopată de un grup de proteine reglatoare din plasmă și de pe suprafața celulelor tisulare, dar inexistente pe suprafața microorganismelor (bacterii, fungi). Polizaharidele lor constituie situsuri de legare pentru C3b și blochează efectele inhibitorii ale proteinelor reglatoare (unele microorganisme au dobândit factori de virulență, care se comportă ca proteine reglatoare ale C, pentru că leagă și inactivează C3b și inhibă fixarea C).

C3 nativ, cu cea mai mare concentrație plasmatică dintre componentele C(600–1800 mg/l) este instabil și se reînnoiește. O formă modificată a lui C3, denumită C3i este echivalentul funcțional al lui C3b, pentru că are o legătură tioester care se leagă covalent cu gruparea $-NH_2$ sau –OH.

Factorul B se leagă de C3b, formând un complex C3bB (cele mai multe molecule de C3b sunt inactivate de factorul H, după formarea complexului C3bH). Unele suprafețe activatoare favorizează legarea factorului B pe C3b după excluderea factorului H. Complexul C3bB este clivat de factorul D (o protează activă din ser). Se formează un fragment mic (Ba) de 30 kD și complexul $\overline{C3bBb}$, *convertaza lui C3*, analog complexului C4b2b al căii clasice.

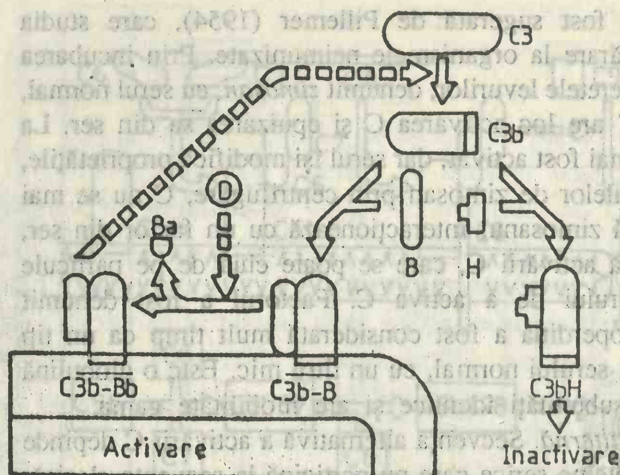


Fig. 81. Reprezentare schematică a căii alterne a fixării complementului. C3b şi factorul B se asociază şi formează complexul C3bB. Factorul B este clivat sub acţiunea proteazei D şi rezultă C3bBb (convertaza lui C3) (după Roitt şi colab., 1985).

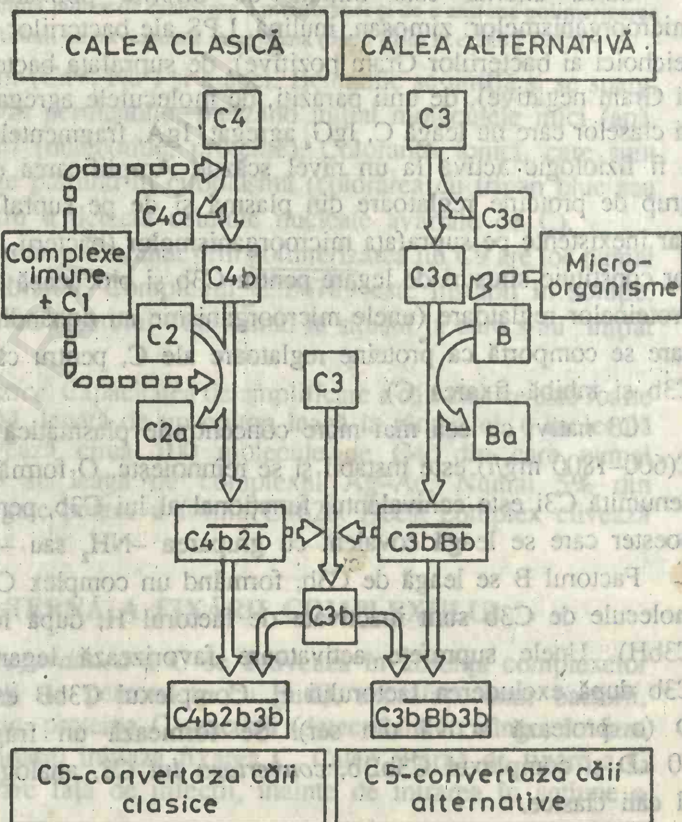


Fig. 82. Analogii şi deosebiri între calea clasică şi cea alternativă de activare a sistemului complement (după Roitt şi colab., 1985).

$\overline{C3bBb}$ se disociază uşor şi îşi pierde activitatea, dar prin legarea proteinei serice P se formează complexul $P\overline{C3bBb}$, relativ stabil, cu proprietăţi proteolitice, care clivează C3 la aceiaşi legătură peptidică, ca şi în calea clasică şi eliberează aceleaşi fragmente, C3a şi C3b.

Această cale se amplifică prin numărul mare de molecule de C3b care se leagă în jurul situsului în care C3b s-a fixat iniţial. Ele captează un număr corespunzător de molecule B şi formează mai multe complexe $P\overline{C3bBb}$ care scindează C3.

Este de subliniat faptul că C3b este atât componentă a complexului enzimatic, cât şi produs al acţiunii sale.

Treptele ulterioare ale activităţii C sunt aceleaşi, descrise la calea clasică. Enzimele de clivare ale lui C3 ($\overline{C4b2b}$ în calea clasică, sau $P\overline{C3bBb}$ din calea alternă) se combină cu una sau mai multe molecule de C3b şi formează convertazele lui C5.

FUNCŢIILE SISTEMULUI COMPLEMENT

Componentele sistemului C realizează 3 categorii de funcţii esenţiale: a) *citoliza* (liza celulelor eucariote şi bacteriene) şi liza virusurilor învelite: b) *opsonizarea*, proces care implică învelirea celulelor străine cu fragmente proteice ale sistemului C şi facilitarea ingestiei lor de către celulele fagocitare; c) *activarea celulară* reuneşte efecte generate de peptide ale activării C, care determină degranularea mastocitelor, migrarea unor celule mobile în focarul de inflamaţie, precum şi intensificarea şi inhibiţia răspunsului imun.

Efectul litic al activării sistemului C s-a studiat asupra hematiilor de berbec, foarte sensibile la acţiunea anticorpilor specifici şi a C. Pe suprafaţa eritrocitului de berbec se găsesc antigenele Forssman, de natură lipopolizaharidică, foarte răspândite în natură (bacterii, plante, unele animale). Ele lipsesc în ţesuturile de iepure şi de aceea, după injectarea hematiilor se formează anticorpi cu titru înalt. Sursa de sistem C este cobaiul. Gradul de liză al hematiilor se măsoară prin determinarea spectrofotometrică a intensităţii culorii hemoglobinei. Proporţia hematiilor lizate, după sensibilizarea cu o doză subaglutinantă de anticorpi creşte odată cu cantitatea de C adăugat în reacţie. *Unitatea hemolitică* a C se defineşte ca fiind cantitatea care lizează 50% din hematiile sensibilizate, în condiţii standardizate (densitatea hematiilor, concentraţia şi titrul anticorpilor, forţa ionică, pH solventului, concentraţia Mg^{2+}, Ca^{2+}, temperatura).

În cazuri patologice (hemoglobinuria paroxistică nocturnă), activarea C are loc *in vivo*. Hematiile se comportă ca o suprafaţă activatoare, iniţiind fixarea C pe calea alternă şi liza, prin activarea componentelor terminale ale C.

IgG anti Rh nu lizează hematiile în prezenţa C, probabil datorită distanţei prea mari între determinanţii antigenici ai suprafeţei eritrocitului.

Bacteriile Gram negative, învelite cu anticorpi pot fi lizate de C prin aceiaşi secvenţă de reacţii ca şi hematiile. Bacteriile Gram pozitive şi micobacteriile sunt rezistente, probabil datorită structurii peretelui celular, deoarece protoplaştii lor sunt lizaţi de C.

In vivo, activarea C, în exces de complexe imune circulante produce avaria celulelor sau favorizează procesele inflamatorii.

Efectul *opsonizant* al activării C este rezultatul formării unui număr mare de molecule de C3b, neimplicate în complexul C4b2b3b sau PC3bBb. Ele formează o pătură moleculară opsonizantă pe celula ţintă, uşurând aderenţa ei de receptorii pentru C3b ai fagocitelor. Formarea unei pelicule de C3b pe celula ţintă este probabil una din cele mai importante funcţii biologice efectoare ale cascadei de activare a C. Receptorii pentru C3b se găsesc şi pe suprafaţa unor celule nefagocitare: limfocitele B, o subpopulaţie a limfocitelor T, dar o importanţă deosebită au receptorii de pe suprafaţa hematiilor (la primate) şi a plachetelor (la neprimate). Receptorii pentru C3b au rol în transportul complexelor Ag–Ac–C, la ficat şi splină, în special pe suprafaţa hematiilor. Legarea complexelor imune pe hematii este esenţială pentru eliminarea lor. Diminuarea activităţii receptorilor hematiei pentru C3b are ca efect persistenţa complexelor imune în circulaţie, depozitarea lor în rinichi şi plămâni, însoţită de manifestări patologice. Mecanismul de clearence mediat de receptorul pentru C3b, probabil a evoluat pentru a elimina cantităţile mari de complexe Ag–Ac–C ce se formează în unele infecţii.

ANAFILATOXINELE

Reacţiile inflamatorii se generează în imediata vecinătate a complexelor imune care fixează C şi rezultatul este creşterea concentraţiei locale de proteine serice (imunoglobuline şi complement) şi a densităţii leucocitelor (fagocite activate).

Clivajul lui C3 şi C5 sub acţiunea convertazelor corespunzătoare eliberează două peptide, C3a şi C5a, de la extremitatea N-terminală a lui C3 şi respectiv a lui C5. Efectele lor sunt diverse, dar în esenţă sunt anafilatoxine. Termenul *anafilatoxină* derivă din faptul că, cobaii suferă şocul fatal, asemănător anafilaxiei, după injectarea unui ser normal, care a fost incubat cu variate substanţe

activatoare ale C, pe una sau alta din căi (inulină, complexe Ag–Ac, talc). Efectul s-a atribuit anafilatoxinelor, care se cunosc a fi fragmentele C4a, C3a, C5a, clivate din C4, C3 şi respectiv din C5.

C4a, C3a şi C5a sunt similare ca structură: C3a şi C4a au 77 aminoacizi, iar C5a are 74 aminoacizi. Toate, la capătul carboxi-terminal au arg.

C3a produce contracţia musculaturii netede în unele organe. Determină eliberarea histaminei din mastocite (histamina este vasoconstrictoare în prima fază şi măreşte permeabilitatea capilară cu producere de edeme; în faza a II-a produce vasodilataţie periferică şi scăderea brutală a tensiunii arteriale). C3a este repede inactivată în umorile organismului, sub acţiunea carboxipeptidazei B, care clivează arg. Se cunoaşte secvenţa aminoacizilor săi, iar activitatea biologică pare să rezide în octapeptidul C-terminal care conţine arg. Injectarea C3a în tegumentul uman iniţiază un răspuns prompt, care imită reacţia de hipersensibilitate imediată (indurare şi eritem), iar efectul este blocat de medicamente antihistaminice.

C5a este de 10–20 ori mai activă decât C3a şi are activităţi biologice mai extinse, dar eficacitatea sa in *vivo* este mai redusă, deoarece numărul moleculelor de C5a formate în cascada de activare este mult mai mic decât al moleculelor C3b. C5a este factorul major al chimiotactismului pentru neutrofile: determină marginaţia lor în vase şi neutropenie circulatorie; activează neutrofilele, declanşând intensificarea metabolismului cu creşterea captării glucozei şi a producerii H_2O_2, cu efect bactericid; intensifică producerea leucotrienelor de către neutrofile (în special LT B4), care prelungesc faza de permeabilitate crescută indusă de C5a; antrenează degranularea mastocitelor; contractă musculatura netedă, iar proprietăţile sale persistă în restul peptidic după scindarea arg.

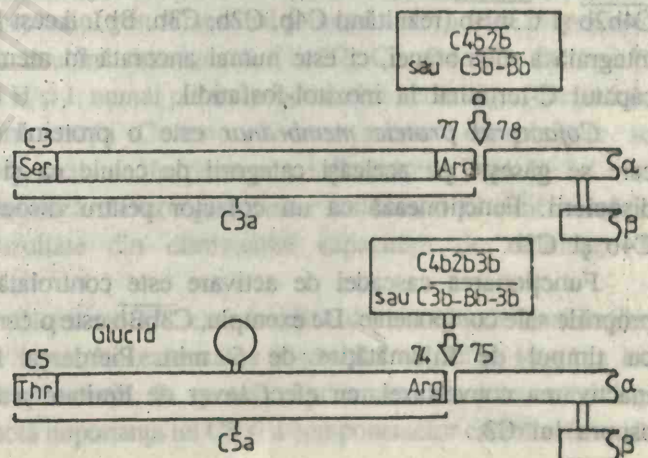


Fig. 83. Anafilatoxinele cascadei de activare a complementului, C3a şi C5a, rezultate prin clivarea enzimatică a lui C3 şi respectiv a lui C5, pe ambele căi, sub acţiunea convertazelor corespunzătoare. La extremitatea COOH, ambele anafilatoxine au restul arg (după Roitt şi colab., 1985).

PROTEINE REGLATOARE ALE ACTIVITĂŢII SISTEMULUI C

Extinderea excesivă a activităţii C este controlată de un set de 7 proteine reglatoare: 5 proteine ce inactivează complexele C în soluţie şi două proteine de membrană ce inactivează complexele C pe celulele normale. Aceste proteine acţionează în principal, prin inhibarea formării, prin accelerarea degradării sau prin inactivarea lui C3b şi a convertazelor lui C3 şi C5.

Activitatea enzimatică a lui Clr şi Cls este reglată de un inhibitor al esterazei Cl (*Cl–INH*). Cl–INH inhibă activarea în faza fluidă a lui Cl, când acesta nu este asociat cu complexe Ag–Ac, rezultatul fiind disocierea rapidă a lui Clr şi Cls de Clq.

Proteina de legare cu C4b(C4bp) se leagă cu C4b şi acţionează ca un cofactor al proteazei serice (factorul I), care degradează C4b.

Factorul I este o serin protează care clivează şi inactivează C4b şi C3b, dar numai în prezenţa cofactorilor C4bp şi H.

Factorul H este elementul cheie care controlează funcţionarea căii alterne. El reglează asocierea dintre C3b şi factorul B. Formarea complexului $\overline{C3bH}$ blochează legarea factorului B. Factorul H disociază complexul $\overline{C3bBb}$.

Factorul H se cuplează cu C3b în oricare din localizările sale, dar în special cu C3b liber în faza fluidă.

Proteina inactivatoare S se combină cu complexele $\overline{C5b67}$ în soluţie şi blochează inserţia lor în membrana celulară. Complexul format ($\overline{C5b67S}$) poate să interacţioneze cu C8 şi C9, dar nu mai are efect litic.

Proteine reglatoare asociate membranei celulare. Pe suprafaţa tuturor celulelor sanguine şi a altor categorii de celule se găseşte *factorul accelerator al disocierii celor două convertaze ale lui C3*. Sub acţiunea sa are loc disocierea complexelor $\overline{C4b2b}$ şi $\overline{C3bBb}$ (rezultând C4b, C2b, C3b, Bb). Acest factor nu este o proteină integrală a membranei, ci este numai ancorată în membrană, prin ataşarea cu capătul C-terminal la inozitol-fosfatidil.

Cofactorul proteic membranar este o proteină integrată în membrană care se găseşte pe aceleaşi categorii de celule ca şi factorul accelerator al disocierii. Funcţionează ca un cofactor pentru disocierea proteolitică a lui C4b şi C3b.

Funcţionarea cascadei de activare este controlată chiar de unele dintre propriile sale componente. De exemplu, $\overline{C3bBb}$ este o convertază relativ instabilă, cu timpul de înjumătăţire de 5 min. Pierderea factorului Bb produce inactivarea convertazei, cu efect sever de limitare a amplificării căii alterne asupra lui C3.

EPUIZAREA EXPERIMENTALĂ A COMPLEMENTULUI SERIC

Diminuarea nivelului complementului plasmatic, la animale se realizează prin injectarea complexelor Ag–Ac formate *in vitro*. Injectarea este însoţită de administrarea antihistaminicelor pentru a preveni şocul anafilactic consecutiv producerii anafilatoxinelor şi eliberării masive a histaminei.

Cea mai selectivă şi amplă depleţie a lui C3 este produsă de veninul de cobră (*Naja naja*). Componenta activă a veninului de cobră (140 kD) este omologă, din punct de vedere funcţional cu C3b, dar este diferită structural de acesta şi este rezistentă la activităţile inhibitoare care se exercită în mod normal asupra lui C3b. Deoarece funcţionează ca C3b, factorul din veninul de cobră (CoF) interacţionează cu factorul B şi activează calea alternă. Se formează un complex stabil, $\overline{PCoFBb}$, cu funcţie de convertază a lui C3. C3b eliberat formează o cantitate mare de PC3bBb, alimentând astfel bucla de amplificare a convertazei C3. Astfel C3 este eliminat eficient pentru 4–96 ore.

Un efect similar, de stabilizare a căii alterne de activare a $\overline{C}$ îl are *factorul nefritic* (autoanticorpi din subclasa IgG3, anti complex enzimatic $\overline{C3bBb}$). Factorul stabilizează complexul $\overline{C3bBb}$, blocând înlocuirea factorului B de către factorul H. Consecinţa este o hipocomplementemie profundă a lui C3, generată printr-un mecanism autoimun.

BIOSINTEZA COMPONENTELOR SISTEMULUI COMPLEMENT

Aproape toate componentele C sunt sintetizate în cea mai mare parte (peste 90%) în ficat, de către hepatocite: C3, C6, C8, factorul B. Fac excepţie componentele Cl, locul sintezei lor fiind epiteliul gastrointestinal şi urogenital. *In vivo*, monocitele sanguine şi macrofagele tisulare sintetizează Cl, C2, C3, C4, C5, factorii D şi B, properdina, factorii H şi I, numai pentru propriile lor necesităţi funcţionale fără să influenţeze concentraţia C seric. Sinteza acestor componente se intensifică în macrofagele activate în procesele inflamatorii.

Deficienţele de biosinteză ale componentelor sistemului C sunt asociate cu stări patologice, rezultate din diminuarea capacităţii de eliminare a complexelor imune.

Deficienţa sintezei Clqrs sau C4 este însoţită de manifestări patologice autoimune carcateristice lupusului eritematos diseminat. Absenţa totală a lui C3 este asociată cu infecţii severe, în special septicemice, cu pneumococi şi meningococi, ceea ce denotă importanţa lui C3 şi a componentelor care îl activează,

în apărarea antiinfecţioasă a organismului. Deficienţele lui C5, C6, C7 sau C8 nu se asociază cu sensibilitate crescută la infecţii.

ROLUL COMPLEMENTULUI ÎN APĂRAREA ANTIINFECŢIOASĂ BACTERIANĂ

Bacteriile Gram pozitive şi Gram negative activează calea altemă a fixării C în absenţa anticorpilor specifici. Moleculele LPS din structura peretelui celulelor Gram negative sunt principalii receptori de C3b şi activează calea altemă, Moleculele de C3b legate pe o suprafaţă activatoare au o afinitate mai mare de interacţiune cu factorul B. Principalul component activator al căii alteme a C, la bacteriile Gram pozitive este peptidoglicanul.

Materialul capsular polizaharidic al bacteriilor patogene Gram pozitive şi Gram negative, în general este ineficient pentru fixarea C, datorită conţinutului său ridicat în acid sialic. Acidul sialic al suprafeţei eritrocitare are funcţii reglatoare asupra activităţii C, mărind afinitatea de legare a factorului H pe C3b legat de eritrocite. Efectul pare a fi similar în cazul acidului sialic din polizaharidul capsular. Imposibilitatea polizaharidelor capsulare de a activa calea altemă a fixării C este cel mai important mecanism prin care bacteriile capsulate evită atacul fagocitelor. Calea altemă este activată de molecule subcapsulare, atât la bacteriile Gram pozitive, cât şi la cele Gram negative.

Activarea C este iniţiată de interacţiunea componentelor sale cu *proteina C reactivă.* Aceasta este un pentamer (sau hexamer) de 115 kD, care se leagă cu mare afinitate de fosforil-colină. Fosforil-colina este un component major al acizilor teichoici din peretele celulelor Gram pozitive. Legarea proteinei C reactive de suprafeţele celulare care conţin fosforil-colină determină activarea căii clasice şi alteme a fixării C.

Fibronectina se poate lega de suprafaţa unor bacterii (streptococi, stafilococi), având rol de opsonină, dar se găseşte şi pe suprafaţa macrofagelor. Fibronectina are afinitate pentru Clq, ceea ce ar putea oferi o capacitate opsonizantă superioară acestei molecule.

Complementul este activat de anticorpi specifici şi efectul este liza celulei bacteriene. Aceşti anticorpi se numesc bactericizi şi aparţin izotipurilor IgM şi IgG. Anticorpii bactericizi au specificitate faţă de proteinele membranare, polizaharidele capsulare, sau faţă de determinanţii repetitivi O ai LPS. Anticorpii faţă de structurile care se extind la o distanţă relativ mare în raport cu suprafaţa celulei bacteriene (fimbrii, flageli) nu au efect bactericid, deoarece activarea C este iniţiată la o distanţă prea mare de structurile de suprafaţă (membrana

externă a bacteriilor Gram negative). Pentru ca efectul litic să aibă loc, trebuie să se producă lezarea ireversibilă a membranei externe şi a stratului peptidoglicanic. Avaria membranei externe deschide calea lizozimului seric, la stratul subţire de peptidoglican situat sub membrana externă. Digestia peptidoglicanului sub acţiunea lizozimului este suficientă pentru a determina liza osmotică a celulei bacteriene. Dacă celula se află într-un mediu protejat osmotic, solubilizarea peptidoglicanului expune membrana citoplasmatică, complexului de atac membranar al C (C5b–C9). Se pare că aceste componente se inseră la situsurile de apoziţie între membrana internă şi cea externă (joncţiunile lui Bayer), unde peptidoglicanul lipseşte. Astfel, complexul de atac membranar are acces direct la membrana citoplasmatică. Dovada indirectă a acestui mecanism de acţiune constă în faptul că celulele în faza de creştere logaritmică sunt mai sensibile la efectul litic al C.

Unele bacterii Gram negative şi toate bacteriile Gram pozitive pot să-şi păstreze viabilitatea în condiţiile activării C. Atributul rezistenţei la factorii serici este un factor de virulenţă al bacteriilor Gram negative, care se comportă ca proteină reglatoare a C; inactivează C3b.

Bacteriile sero-rezistente determină bacteriemii cu o frecvenţă mai mare, deoarece supravieţuiesc factorilor serici. Ele provoacă mai frecvent infecţii profunde ale tractului urinar (pielonefrite), faţă de liniile sensibile la factorii litici ai serului, care provoacă o bacteriurie asimptomatică sau o cistită.

Tulpinile de *Neisseria* sunt exemple ilustrative ale raportului dintre rezistenţa la factorii serici şi virulenţă. Toate tulpinile care produc bacteriemii sunt serorezistente, iar *N. gonorrhoeae* care provoacă infecţii genitale localizate şi *N. meningitidis* care colonizează mucoasele sunt sensibile la componentele serice.

Structurile bacteriene care determină rezistenţa la factorii serici sunt, în primul rând, moleculele de LPS întregi, care posedă lanţurile polizaharidice O laterale. Celulele care sintetizează polizaharidul O sunt variantele virulente care formează colonii S. Mutantele care cresc sub forme coloniale R, cu LPS incomplete sunt sensibile la factorii serici. Variantele coloniale S fixează C, dar complexul de atac membranar nu reuşeşte să avarieze membrana externă sau pe cea internă. Cel mai adesea, activarea C este iniţiată de moleculele LPS, cu lanţuri laterale polizaharidice lungi, la o distanţă prea mare de domeniul hidrofob al membranei externe şi astfel efectul bactericid nu se produce.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BACH J. F., 1976 – *Imunologie, Flamarion Medicine Science*, Paris VI.
2. CLARK E. A., P. J. LANE, 1991 – *Regulation of Human B cell activation and adhesion* – Ann. Rev. Immun, 9, 97–127.
3. DOHERTY P. C., 1980 – Surveillance of self: *CMI to virally modified cell surface defined operationally by the MHC – Progress in Immunology, Ed. M. Fougereau and J. Dausset*, Acad. Press.
4. EWYK VAN W., 1991 – *T-cell differentiation is influenced by thymus microenvironments* – Ann. Rev. Immun., 9, 591–615.
5. FAUVE R. M., 1980 – *Inflamation and natural immunity, în vol. Progress in Immunol.*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
6. GREY H. M., A. SETTE, S. BUNS, 1989 – *How T cell see Antigen*, Sci. Amer. Nov.
7. HOOD L. E., I. L. WEISSMAN, W. B. WOOD, J. H. WILSON, 1984 – *Immunology, The Benjamin Cummings Publ.* Co. Inc., Menlo Park, California.
8. KLEBANOFF S. J., 1979 – *Oxygen dependent antimicrobial sustem of the neutrophil* – Microbiology, Ed. D. Schlessinger.
9. LEDER P., E. E. MAX, J. G. SEIDMAN, 1980 – *The organization of Ig genes and the origin of diversity, Fourth Congress of Immunol.*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
10. LE MINOR L., M. VERON, 1991 – *Bacteriologie Medicale, Flamarion Medicine Sciences.*
11. MALE D., B. CHAMPION, ANNE COOKE, 1987 – *Advanced Immunology*, J. B. Lippincot Company.
12. MC CORMACK W. T., L. W. TJOELKER, C. B. THOMPSON, 1991 – *Avian B cell development* – Ann. Rev. Immun., 9, 219–241.
13. MIDDLEBROOK J. L., DORLAND R. B., 1984 – *Bacterial Toxins. Cellular Mechanisms of action*, Micr. Rev., 48, 3, 419–443.
14. MILSTEIN C., M. R. CLARK, G. GALFRE, A. CUELLO, 1980 – *Monoclonal Antibodies from Hybrid Myelomas, în vol. Progress in Immunology*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
15. MURPHY B. R., R. M. CHANOCK, 1991 – *Immunization against Viruses, în vol. Fundamental Virology I, Eds. Fields B. N., D. M. Knipe, Raven Press*, Ltd., New York.
16. MOGENSEN S. C., 1979 – *Role of Macrophages in natural resistance to Virus infections*, Micr. Rev., 43, 1, 1–26.
17. NEVEU P. J., 1986 – *The Mononuclear Phagocyte System*, Bull. Inst. Pasteur, 84, 23–66.
18. OLINESCU A., LUCIA ANDRIEŞ, 1992 – *Compendiu de Imunologie fundamentală*, Editura Ştiinţa Chişinău.

19. ROITT I. M., J. BROSTOFF, D. MALE, 1985 – *Immunologie fondamentale et appliquée, Medecine et Sciences Internationales*, Paris.
20. ROTHBARD J. B., M. L. GEFTER, 1991 – *Interactions between Immunogenic peptides and MHC proteins* – Annu. Rev. Immun., 9, 527–565.
21. SELA M., 1969 – *Antigenicity. Some molecular Aspects.* Science, 166, 1365.
22. SHARON N., HALINA LIS, 1993 – *Carbohydrates in cell Recognition*, Sci. Amer., 268, January.
23. SMITH A. K., 1990 – *Interleukin-2*. Sci. Amer., 265, March.
24. STARR M. P., H. STOLP, H. G. TRUPER, A. BALOWS, H. G. SCHLEGEL, *1981 – The Prokaryotes*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
25. STEINMAN M. R., 1991 – *The dendritic Cell System and its role in Immunogenicity*, Ann. Rev. Immun., 9, 591–615.
26. VITETTA S. ELLEN, M. T. BERTON, C. BURGER, M. KEPRON, W. T. LEE and XIAO MING YIN, 1991 – *Memory B and T cells, Ann.* Rev. Immun, 9, 193–217.
27. ZARNEA G., 1970 – *Microbiologie generală*, Editura Academiei R.S.R.
28. ZARNEA G., 1990 – *Tratat de Microbiologie generală, vol.* IV Imunobiologie, Editura Academiei Române.

[illegible] SELECTIVĂ

1. BACH J. F., 1976 – *Immunologie, Flammarion Médecine Sciences* [illegible]
2. [illegible]
3. DOHERTY P. [illegible] *MHC* [illegible] *Immunology* [illegible] Acad. Press.
4. EWYK VAN W., 1991 – *T-cell differentiation is influenced by thymus microenvironments* – Ann. Rev. Immun., 9, [illegible]–615.
5. FAUVE R. M., 1980 – *Inflammation and natural immunity, in vol. Progress in Immunol.* Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
6. GREY H. M., A. SETTE, S. BUNS, 1989 – *How T cell see Antigen*, Sci. Amer./Nov.
7. HOOD L. E., I. L. WEISSMAN, W. B. WOOD, J. H. WILSON, 1984 – *Immunology, The Benjamin Cummings Publ.* Co. Inc., Menlo Park, California.
8. KLEBANOFF S. J., 1979 – *Oxygen dependent antimicrobial system of the neutrophil* – Microbiology, Ed. D. Schlessinger.
9. LEDER P., E. E. MAX, J. G. SEIDMAN, 1980 – *The organization of Ig genes and the origin of diversity. Fourth Congress of Immunol.*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
10. LE MINOR L., M. VERON, 1991 – *Bactériologie Médicale, Flammarion Médecine Sciences.*
11. MALE D., B. CHAMPION, ANNE COOKE, 1987 – *Advanced Immunology*, J. B. Lippincott Company.
12. MC CORMACK W. T., L. W. TJOELKER, C. B. THOMPSON, 1991 – *Avian B cell development* – Ann. Rev. Immun., 9, 219–241.
13. MIDDLEBROOK J. L., DORLAND R. B., 1984 – *Bacterial Toxins: Cellular Mechanisms of action*, Micr. Rev., 48, 3, 419–443.
14. MILSTEIN C., M. R. CLARK, G. GALFRE, A. CUELLO, 1980 – *Monoclonal Antibodies from Hybrid Myelomas, in vol. Progress in Immunology*, Ed. M. Fougereau and J. Dausset, Acad. Press.
15. MURPHY B. R., R. M. CHANOCK, 1991 – *Immunization against Viruses, in vol. Fundamental Virology*, Eds. Fields B. N., D. M. Knipe, Raven Press, Ltd., New York.
16. MOGENSEN S. C., 1979 – *Role of Macrophages in natural resistance to Virus infections*, Micr. Rev., 43, 1, 1–26.
17. NEVES P. J., 1986 – *The Mononuclear Phagocytic System*, Bull. Inst. Pasteur, 84, 23–66.
18. OLINESCU A., LUCIA ANDRIES, 1982 – *Compendiu de Imunologie fundamentală*, Editura Știința Chișinău.

Tiparul s-a efectuat sub c-da nr. 76/1994
la Tipografia Editurii Universităţii Bucureşti

ISBN 973-9160-37-9

Lei 3120